



Validação de métodos na análise química em vinhos

Ana Catarina Rodrigues Moreira

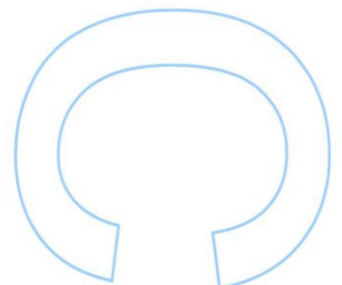
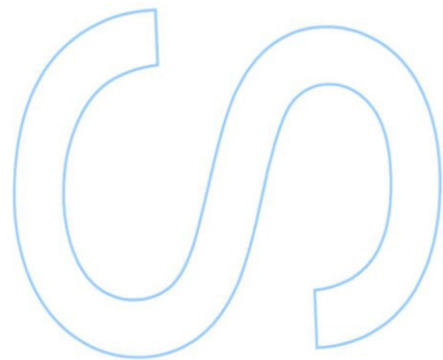
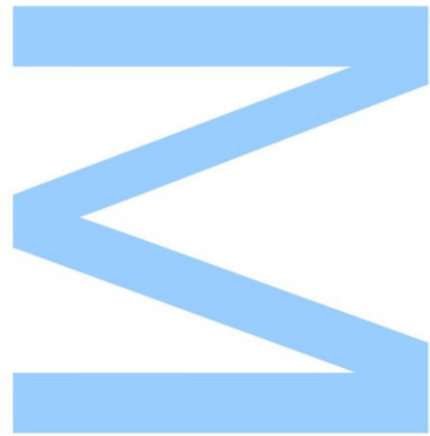
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências,
Universidade do Porto
2017

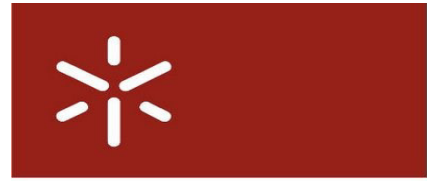
Orientador (Faculdade)

Nuno Filipe da Cruz Baptista Mateus, Professor Associado,
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Orientador (Empresa)

Alice Helena Machado Freitas dos Santos, Química Industrial,
Silliker Portugal S.A.





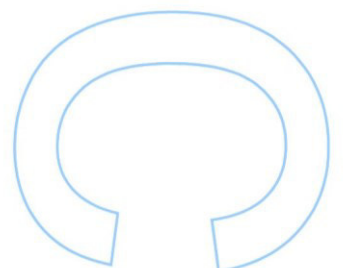
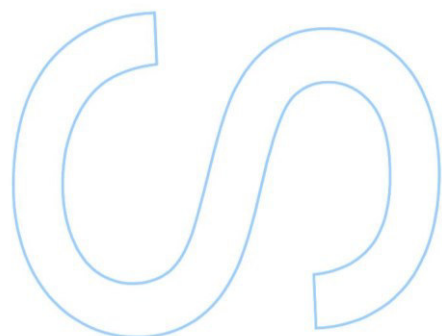
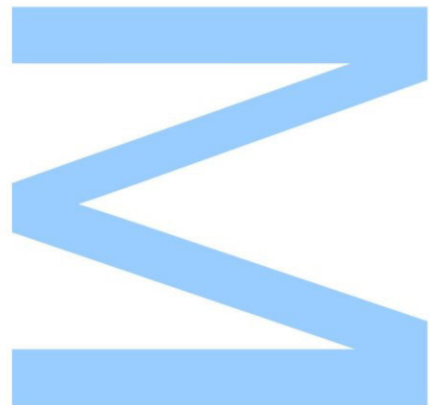
Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a elaboração deste trabalho, e que de certa forma fizeram parte desta etapa da minha vida.

À Silliker Portugal, pela possibilidade de estágio, em especial à Dra. Alice Santos, Laura Sousa e à analista Célia Almeida pelos conselhos, conhecimento transmitido e atenção para obter bons resultados.

Ao Prof. Doutor Nuno Mateus, pela sua disponibilidade e orientação ao longo deste percurso.

Aos meus pais e irmão por todo o apoio, amor e carinho nesta fase tão importante da minha vida.

Às minhas avós e tios, por todo o interesse e apoio.

Ao Tiago, por todo o amor, incentivo, apoio, carinho, e acima de tudo paciência nos momentos mais difíceis.

E a todos aqueles não mencionados, mas que de uma maneira ou de outra me apoiaram, não estão esquecidos.

Muito OBRIGADA a todos!

Resumo em português

A validação de um método analítico é responsável por balizar o desempenho do método, avaliando parâmetros como a exatidão, precisão, seletividade, linearidade e gama de trabalho, limites de deteção e quantificação, variações intralaboratoriais e interlaboratoriais.

O presente trabalho foi realizado na empresa Silliker, no âmbito do Estágio Curricular do Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar da FCUP/UM. Teve como objetivos:

- ✓ Validação de um método analítico para a determinação de Anidrido Sulfuroso Livre presente nos diferentes tipos de vinho, por iodometria;
- ✓ Validação de um método analítico para a determinação de Anidrido Sulfuroso Total presente nos diferentes tipos de vinho, por iodometria;
- ✓ Validação de um método analítico para a determinação de Cloretos presente nos diferentes tipos de vinho, por potenciometria.

Numa fase inicial, foi elaborado um procedimento interno para todos os métodos analíticos aplicados em vinhos, uma vez que as normas portuguesas utilizadas para a elaboração destes se encontravam em vigor, mas desatualizadas.

Após a realização de um estudo dos limiares analíticos, da linearidade, da precisão e da exatidão, os métodos foram validados para a determinação de anidrido sulfuroso livre, total e cloretos.

O processo de validação de métodos analíticos em vinhos ainda não está concluído. No entanto, o laboratório continuará a validação para os restantes métodos analíticos não abordados neste trabalho.

Palavras-chave: Validação de Métodos, Iodometria, Potenciometria, Anidrido Sulfuroso Livre, Anidrido Sulfuroso Total, Cloretos, Vinho.

Abstract

The validation of an analytical method is responsible for determining the performance of the method, evaluating parameters such as accuracy, precision, selectivity, linearity and range of work, limits of detection and quantification, intra-laboratory and interlaboratory variations.

The present work was carried out in the company Silliker, within the scope of the curricular training of the Master in Technology and Food Science of the FCUP / UM. It had as objectives:

- ✓ Validation of an analytical method for the determination of free sulfur dioxide present in different types of wine by iodometry;
- ✓ Validation of an analytical method for determination of total sulfur dioxide present in different types of wine by iodometry;
- ✓ Validation of an analytical method for the determination of Chloride present in different types of wine by potentiometry.

At an early stage, an internal procedure was developed for all analytical methods applied to wines, since the Portuguese official methods used for the preparation of these wines were in force but out of date.

After a study of the analytical thresholds, linearity, precision and accuracy, the methods were validated for the determination of free, total sulfur dioxide and chlorides.

The process of validating analytical methods in wines is not yet complete. However, the laboratory will continue validation for the remaining analytical methods not addressed in this paper.

Keywords: Validation of Methods, Iodometry, Potentiometry, Free Sulfur dioxide, Total Sulfur dioxide, Chlorides, Wine.

Índice

1.Introdução.....	1
1.1 Objetivos do trabalho.....	1
1.2 A empresa de acolhimento.....	1
1.3 Enquadramento histórico das bebidas alcoólicas	3
1.4 Determinação dos teores de anidrido sulfuroso livre e total.....	7
1.4.1 A presença de dióxido de enxofre nos vinhos	7
1.4.2 O emprego do SO ₂ na vinificação e na conservação dos vinhos.....	9
1.4.3 Limites legais dos teores de dióxido de enxofre	10
1.4.4 Método Ripper	11
1.5 Determinação do teor de cloretos nos vinhos.....	13
1.5.1 A presença de cloretos nos vinhos	13
1.5.2 O emprego dos cloretos na vinificação e na conservação dos vinhos.....	14
1.5.3 Limites legais dos teores de cloretos	14
1.5.4 Método Potenciométrico	15
1.6 Validação de métodos de análise química.....	16
1.6.1 Linearidade	16
1.6.2 Limiares Analíticos do Método de ensaio.....	16
1.6.3 Sensibilidade	17
1.6.4 Precisão.....	18
1.6.5 Exatidão.....	20
2. Execução experimental.....	22
2.1 Método da determinação de teores de anidrido sulfuroso livre e total	22
2.1.1 Reagentes	22
2.1.2 Material e instrumentação.....	22
2.1.3 Procedimento experimental	23
2.2 Método da determinação do teor de cloretos (método potenciométrico).....	23
2.2.1 Reagentes	23

2.2.2 Material e Instrumentação.....	24
2.2.3 Procedimento experimental	24
3. Resultados obtidos e discussão.....	27
3.1 Validação do método analítico para a determinação do teor de anidrido sulfuroso livre	27
3.1.1 Limiares analíticos	27
3.1.2 Precisão.....	28
3.1.3 Exatidão.....	34
3.2 Validação do método analítico para a determinação do teor de anidrido sulfuroso total	35
3.2.1 Limites analíticos	35
3.2.2 Precisão.....	36
3.2.3 Exatidão.....	41
3.3 Validação do método analítico para a determinação do teor de cloretos	43
3.3.1 Limites analíticos	43
3.3.2 Precisão.....	44
3.3.3 Exatidão.....	49
4. Conclusão.....	51
5. Referencias bibliográficas	53
6. Anexos.....	64
Anexo 1.....	64
Anexo 2.....	66
Anexo 3.....	70

Índice de tabelas

Tabela 1. Limites analíticos e limites de emprego de dióxido de enxofre total, em bebidas espirituosas (Instituto da Vinha e do Vinho, 2017; Europeia, 2009).	11
Tabela 2. Limites estabelecidos para os cloretos dos vinhos (IVV, 2017).	14
Tabela 3. Valor do limite de quantificação e deteção obtido para a determinação do teor de anidrido sulfuroso livre	28
Tabela 4. Estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso livre.....	29
Tabela 5. Resultados obtidos para o teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso livre	30
Tabela 6. Resultados obtidos para o teste C de Cochran na determinação do teor de anidrido sulfuroso livre	30
Tabela 7. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho Branco	31
Tabela 8. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho Tinto	31
Tabela 9. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho Rosé	32
Tabela 10. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho do Porto	32
Tabela 11. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de Sangria	33
Tabela 12. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de Espumante.....	33
Tabela 13. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ < 10 na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso livre	34
Tabela 14. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ (20-40) na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso livre	34
Tabela 15. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ > 40 na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso livre	35
Tabela 16. Valor do limite de quantificação e deteção obtido para a determinação do teor de anidrido sulfuroso total.....	36
Tabela 17. Estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso total	37
Tabela 18. Resultados obtidos para o teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso total.....	38

Tabela 19. Resultados obtidos para o teste C de Cochran na determinação do teor de anidrido sulfuroso total.....	38
Tabela 20. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho Branco.....	39
Tabela 21. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho Tinto	39
Tabela 22. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho Rosé.....	40
Tabela 23. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho do Porto.....	40
Tabela 24. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de Sangria	41
Tabela 25. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de Espumante.....	41
Tabela 26. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com $LQ < 40$ na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso total.....	41
Tabela 27. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com $LQ > 40$ na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso total.....	42
Tabela 28. Valor do limite de quantificação e deteção obtido para a determinação do teor de cloretos	44
Tabela 29. Estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de cloretos.....	45
Tabela 30. Resultados obtidos para o teste de grubbs na determinação do teor de cloretos	46
Tabela 31. Resultados obtidos para o teste C de Cochran na determinação do teor de cloretos	46
Tabela 32. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho Branco	47
Tabela 33. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho Tinto	47
Tabela 34. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho Rosé.....	48
Tabela 35. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho do Porto.....	48
Tabela 36. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de Sangria	49
Tabela 37. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de Espumante.....	49

Tabela 38. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com $LQ < 20$ na análise da exatidão para o método de cloretos	49
Tabela 39. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com $LQ > 20$ na análise da exatidão para o método de cloretos	50
Tabela 40. Valores críticos para teste de Grubbs	64
Tabela 41. Valores críticos para teste C de Cochran	65
Tabela 42. Resultado do estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso livre	66
Tabela 43. Resultados obtidos para o estudo do teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso livre	67
Tabela 44. Resultado do estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso total Erro! Marcador não definido.	
Tabela 45. Resultados obtidos para o estudo do teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso total	68
Tabela 46. Resultado do estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de cloretos	69
Tabela 47. Resultados obtidos para o estudo do teste de grubbs na determinação do teor de cloretos	69
Tabela 48. Resultados do estudo da exatidão na determinação de anidrido sulfuroso livre	70
Tabela 49. Resultados do estudo da exatidão na determinação de anidrido sulfuroso total.....	73
Tabela 50. Resultados do estudo da exatidão na determinação de cloretos	77

Índice de Figuras

Figura 1. Vista frontal das instalações da empresa Silliker Portugal, S.A., sediada em Canelas, Vila Nova de Gaia	2
Figura 2. Iodomatic Quéré, Bordeaux (Latorre, 2017)	12
Figura 3. Montagem do método potenciométrico (Escolas, 2017)	15

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Consumo anual de álcool per capita (VANDENBERG, 2016).....	6
Gráfico 2. Participação de jovens de 15 anos que beberam álcool em 2002 vs 2010 (VANDENBERG, 2016).	6

Índice de Equações

Equação 1. Cálculo do Limite de Detecção	17
Equação 2. Cálculo do Teste de Grubbs.....	18
Equação 3. Cálculo do Teste C de Cochran	19
Equação 4. Cálculo da Incerteza	19
Equação 5. Limite de Quantificação do Anidrido Sulfuroso Livre (NP 2220/1987)	27
Equação 6. Limite de Quantificação do Anidrido Sulfuroso Total (NP 2220/1987)	35
Equação 7. Limite de Quantificação dos Cloretos (NP 2226/1988)	43

Lista de abreviaturas

AV- Valor atribuído
C- Valor teste de Cochran
EGI- Sociedade de Engenharia e Gestão de Qualidade Industrial, Lda
EIL – Ensaios Interlaboratoriais
EMF – Força eletromotriz (*electromotive force*)
EN – Norma Europeia
FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations
G– Valor teste de Grubbs
IEC- International Engineering Consortium
IPAC – Instituto Português de Acreditação
ISO- *International Organization for Standardization*
IVV - Instituto da Vinha e do Vinho
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
LV- valor do laboratório
NP – Norma Portuguesa
OCDE- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OGM – Organismos geneticamente modificados
OIV- International Organisation of Vine and Wine
OMS - Organização Mundial de Saúde

Lista de símbolos

k- Fator de cobertura (normalmente 2)

s– Desvio padrão

s^2 – Variância

SO₂ - Dióxido de enxofre

S_R- Desvio padrão robusto

p- Número de laboratórios num dado nível

P- População

x_i – Observação da amostra

\bar{x} – Valor médio

x_{prec} – Incerteza da precisão

$\sum_{i=1}^{\infty} i$ - Somatório

ΔL - Valor lido

ΔC - Variação da concentração

1.Introdução

1.1 Objetivos do trabalho

O Estágio em Contexto Empresarial foi realizado no laboratório de química da Silliker Portugal S.A. Este estágio teve por base o desenvolvimento das competências profissionais destinadas à segurança e qualidade alimentar, à integração no meio empresarial e rotina laboratorial e ao emprego dos conceitos adquiridos ao longo do curso. O trabalho realizado integrou:

- ✓ Validação de um método analítico para a determinação de anidrido sulfuroso livre presente nos diferentes tipos de vinho, por iodometria;
- ✓ Validação de um método analítico para a determinação de anidrido sulfuroso total presente nos diferentes tipos de vinho, por iodometria;
- ✓ Validação de um método analítico para a determinação de Cloretos presente nos diferentes tipos de vinho, por potenciometria.

1.2 A empresa de acolhimento

O presente trabalho foi concretizado na Empresa Silliker Portugal, S.A., empresa independente que fornece serviços no setor agro-alimentar (Merieux Nutrisciences, 2016).

A sua atividade iniciou-se no lugar da Rechousa, Vila Nova de Gaia, no ano de 1992. Desde a sua formação até março de 2008, a sua designação era EGI- Sociedade de Engenharia e Gestão de Qualidade Industrial, Lda, passando posteriormente a uma nova identidade (Silliker Portugal, S.A.), em consequência da aquisição de 86% das ações da EGI pelo grupo Silliker. Em março de 2005 são inauguradas as novas instalações situadas na freguesia de Canelas, concelho de Vila Nova de Gaia (Figura 1) (Silliker, 2016).

Atualmente, o grupo Silliker está presente em 15 países e concentra a sua atividade na busca de soluções para os desafios atuais do setor com apoio a distintas empresas (Merieux NutriSciences, 2016).



Figura 1. Vista frontal das instalações da empresa Silliker Portugal, S.A., sediada em Canelas, Vila Nova de Gaia

A nível da sua estrutura orgânica, a Silliker Portugal é constituída por vários especialistas distribuídos por diversas áreas do setor alimentar que garantem a qualidade dos serviços, adequação dos métodos, atualização permanente de procedimentos e equipamentos e no sistema de melhoria contínua (Silliker, 2016).

A Silliker oferece uma polivalência de serviços, entre os quais se inclui o serviço de análises microbiológicas, químicas e sensoriais, consultadoria em segurança alimentar e desenvolvimento, auditorias, rotulagem e legislação (Silliker, 2016).

A sua missão tem por objetivo garantir serviços de qualidade e resultados de elevado rigor e segurança, que cativem e satisfaçam as necessidades dos clientes, num ambiente agradável com um grupo motivado e em constante desenvolvimento (Merieux Nutrisciences, 2016; Silliker, 2016).

Desde 1993, integra o sistema Português de Qualidade pela acreditação do seu laboratório (certificado nºL0087). Todos os laboratórios Silliker são acreditados por um organismo independente de acordo com o referencial ISO/IEC 17025. Este fornece uma avaliação objetiva da competência técnica dos laboratórios e assegura a "precisão, exatidão e repetibilidade" dos resultados analíticos (Merieux Nutrisciences, 2016; Silliker, 2016).

A Silliker Portugal, S.A, é distribuída por duas grandes áreas de trabalho: Laboratorial e Administrativa. Os laboratórios de análises físico químicas, métodos de análise instrumental e microbiológicas estão equipados com os meios técnicos adequados e uma equipa de técnicos especializados habilitados a realizar múltiplas técnicas de análise. O departamento de assessoria técnica está vocacionado para as áreas do HACCP, Qualidade, Higiene e Segurança Alimentar, Formação Profissional e Desenvolvimento (Silliker, 2016).

Os laboratórios Silliker foram projetados dentro das exigências e padrões internacionais e contam com a melhor tecnologia e um grupo de trabalho experiente, de modo a garantir a fiabilidade esperada pelos clientes. Verificam a conformidade relativamente a cadernos de encargos, especificações e legislação portuguesa e comunitária (avaliação da conformidade dos resultados). Paralelamente, estabelecem e controlam os parâmetros nutricionais dos alimentos, apoiam a verificação da produção das indústrias agroalimentares e efetuam o controlo de alergénios e de organismos geneticamente modificados (OGM). Por fim, garantem a inocuidade dos alimentos através da análise de contaminantes (Silliker, 2016).

1.3 Enquadramento histórico das bebidas alcoólicas

Portugal, à semelhança da grande parte da Europa mediterrânea, é herdeira de uma longa tradição vitivinícola. O consumo de vinho ao longo do tempo foi incorporado nos nossos rituais e tradições e hoje faz parte da chamada “dieta mediterrânica”, exercendo uma poderosa influência em diversos sectores económicos de grande importância como o turismo, restauração, lazer, indústria produtora, etc. Foi nesta cultura europeia mediterrânea que ao longo dos séculos se integrou socialmente a produção, transformação e comercialização vitivinícola (Balsa, 2011).

No que respeita à produção de vinho, a nível da União Europeia, Portugal representa o 4º lugar, de uma hierarquia em que a Itália se situa no topo, seguindo-se a França e a Espanha. A Eslovénia e a República Checa ocupam os últimos lugares (Instituto do Vinho e da Vinha, 2009).

Do ponto de vista descritivo e classificativo compreende-se o conceito de bebidas alcoólicas como bebidas que contêm álcool (seu principal componente) (UNODCCP, 2000). Estas podem ser fermentadas, no caso do vinho e da cerveja, quando, por um lado se obtém a fermentação alcoólica dos sumos açucarados pela ação de leveduras, ou por outro, a destilação do álcool no decurso da fermentação, agora para o caso das aguardentes e licores (Mello, 2001).

Os Árabes foram os pioneiros na produção de álcool destilado; técnica que mais tarde os europeus adotaram tendo sido generalizada na Europa a partir do século XI. Na Idade Média, com o desenvolvimento da destilação do álcool, que permitia uma maior distribuição do grau alcoométrico, verificou-se uma maior disponibilidade de bebidas alcoólicas, no entanto com preços elevados. O consumo de bebidas alcoólicas até cerca de 1500 era inacessível à maioria da população, e o seu uso estava associado a conceitos de saúde e bem-estar, sendo a sua nomenclatura de *aqua vitae*. A partir do

século XV, o consumo de bebidas alcoólicas aumenta e surgem os primeiros registos de intoxicação por álcool.

Numa tentativa de combater o consumo excessivo de álcool durante o século XVIII, o parlamento inglês aprova a repressão da embriaguez, e nos Estados Unidos da América são criadas leis para controlar o crescente número de pessoas embriagadas, criando impostos sobre o álcool e uma tentativa de definição do conceito de embriaguez.

Com a Revolução Industrial, a partir do século XIX, o consumo de álcool aumenta, em estreita ligação ao crescimento da sua produção e facilidade de acesso. Em corolário, problemas surgem associados ao aumento do número de pessoas consumidoras de álcool.

Entre os pensadores mais astutos iniciava-se discussões acerca de novas definições do alcoolismo e do alcoólico, no contexto de crescente abuso do consumo de álcool. Para Fouquet (Mello, 2001) o “alcoólico é todo aquele que perdeu a liberdade de se abster do álcool, e que, por conseguinte, não exerce controlo no seu consumo”, enquanto que para Jellinek o “alcoolismo é todo o uso de bebidas alcoólicas suscetíveis de causar prejuízo no indivíduo, na sociedade, ou em ambos” (Mello, 2001).

Anos mais tarde, a Organização Mundial de Saúde apresenta novas definições para alcoolismo e alcoólico, com a defesa de que “o alcoolismo não constitui uma entidade nosológica definida, mas a totalidade dos problemas motivados pelo álcool, no indivíduo, estendendo-se em vários planos e causando perturbações orgânicas e psíquicas, perturbações da vida familiar, profissional e social, com as suas repercussões económicas, legais e morais”, e “os alcoólicos são bebedores excessivos, cuja dependência em relação ao álcool se acompanha de perturbações mentais, da saúde física, da relação com os outros e do seu comportamento social e económico. Devem submeter-se a tratamento.” (Mello, 2001).

Atualmente, a Europa é o continente onde o consumo de álcool é mais elevado. Tem-se assistido a alterações em termos de padrões de consumo, dos tipos de bebidas ingeridas e da forma como são ingeridas (*binge drinking*). Portugal não foge a esta regra, apresentando um dos maiores consumos de álcool *per capita* a nível mundial, segundo os últimos relatórios do World Drink Trends (2002, 2005).

O álcool é uma das principais causas de problemas de saúde e mortalidade prematura. É responsável por 1 em 17 mortes, e por uma proporção significativa de deficiências, especialmente no sexo masculino (VANDENBERG, 2016).

O grau alcoométrico de uma bebida é definido pela percentagem volumétrica de álcool puro que contém, ou seja, se um vinho contiver 10°, significa que em 1L de bebida 10% é de álcool (100ml ou 80g de álcool). No caso das bebidas fermentadas, estas

geralmente têm uma graduação alcoólica até um máximo de 13 a 14%, e os valores para as destiladas variam, normalmente, entre os 15 e os 75% (Mello, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Moraes e Locatelli, 2010), o consumo moderado de vinho (uma a duas unidades de bebida por dia, correspondendo cada unidade a 150 mL de vinho) representa baixo risco para o aparecimento de doenças. Para o sexo masculino, a dose recomendada centra-se nos 30g/dia (duas doses), em oposto ao sexo feminino com uma dose inferior de cerca de 15 g/dia (1 dose).

Na Europa, as tendências políticas sobre o álcool estão influenciadas pelas culturas tradicionais de consumo, pelo que estratifica este cenário em três grandes grupos de países: Europa do Norte ou área “seca” (Finlândia, Suécia e Noruega), em que os consumidores escolhem as bebidas espirituosas (também de cerveja) como preferenciais, consumindo-as durante o fim de semana e fora das refeições; Europa Central, consumidores predominantes de cerveja (Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Holanda, Irlanda, Luxemburgo e Reino Unido); e a Europa do Sul ou Mediterrânicos, ou área “líquida”, consumidores preferenciais de vinho com consumo diário em particular às refeições (Espanha, Grécia, França, Itália, Portugal). Em geral, são caracterizados pela sua raiz latina, tradição rural, vínculo familiar forte e uma industrialização relativamente recente (BALSA, 2011).

Outros fatores como os ambientais, o desenvolvimento económico, o local de consumo, o nível e a facilidade ou não de acesso ao álcool, a par das tendências históricas de consumo, dos danos relacionados com o volume de álcool consumido, o padrão de beber e, em raras ocasiões, a qualidade e o gosto de álcool consumido, igualmente contribuem como elementos classificativos e influenciáveis da estratificação anteriormente apresentada (SPENCE e PIQUERAS-FISZMAN, 2014).

Num país da OCDE, a média de consumo de um adulto é de 9,1 litros de álcool puro por ano. Os países com maior consumo de álcool, denunciando valores no patamar dos 12,0 litros ou mais por adulto/ano, para o ano de 2012 foram a Áustria, Estónia e França. Apesar do consumo médio de álcool ter diminuído de forma gradual ao longo das últimas duas décadas, em alguns países europeus do Norte, como a Finlândia, Islândia, Noruega e Suécia, o consumo tem vindo a aumentar (VANDENBERG, 2016).

Em Portugal, apesar do ligeiro decréscimo demonstrado nos últimos dados disponíveis, verificou-se que o consumo de álcool *per capita* mantém-se bastante elevado. O mesmo se tem verificado na restante Europa para os referentes consumos crescentes de álcool entre jovens e mulheres (BALSA, 2011).

Segundo um estudo da OCDE, o consumo de álcool *per capita* anual em jovens a partir dos 15 anos de idade diminuiu, quando observamos o consumo de álcool puro em litros (Gráfico 1).

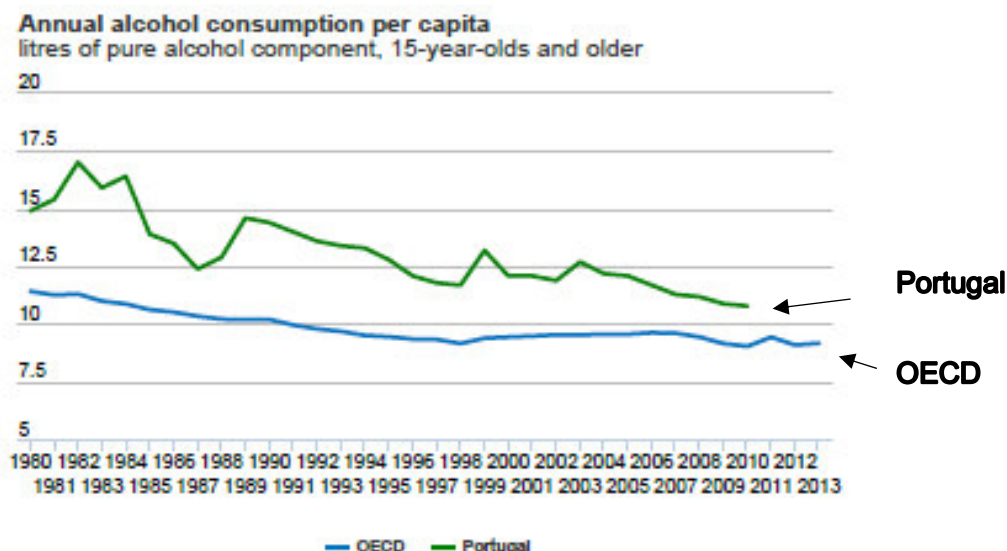


Gráfico 1. Consumo anual de álcool per capita (VANDENBERG, 2016).

O estudo apresentado faz uma comparação da participação de jovens de 15 anos que beberam álcool, dentro da Europa, no ano de 2002 em oposição a 2010. Verificou-se que de um modo geral o consumo de álcool entre os jovens tem vindo a aumentar significativamente (Gráfico 2).

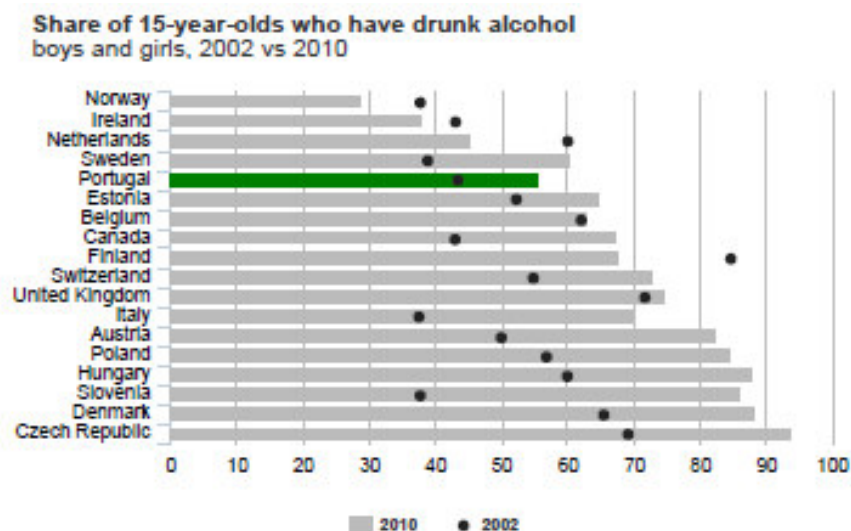


Gráfico 2. Participação de jovens de 15 anos que beberam álcool em 2002 vs 2010 (VANDENBERG, 2016).

1.4 Determinação dos teores de anidrido sulfuroso livre e total

1.4.1 A presença de dióxido de enxofre nos vinhos

Os sulfitos ou agentes sulfitantes utilizados ao longo da história como ingredientes de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos, incluem o dióxido de enxofre (SO_2) e as diversas formas de sulfitos inorgânicos que libertam SO_2 nas condições de uso (TAYLOR et al., 1986; LECLERCQ et al., 2000).

O SO_2 , gás incolor formado por combustão de enxofre e dos sulfuretos (Curvelo-Garcia, A.S, 1988) é corrosivo e nocivo, mas no que toca a SO_2 presente nos vinhos, Wucherpfennig (1983) considera-se que não são verificadas lesões provocadas pelos teores normais apresentados, manifestando-se, todavia, efeitos secundários desagradáveis.

Para garantir a qualidade do vinho e prevenir alergia a alguns indivíduos (ANIBARRO et al., 1992; PERONI & BONER, 1995), os teores de SO_2 devem ser regulados, monitorizados e mais baixos possíveis. Segundo a FAO e a OMS, a dose diária aceitável será de 0,7mg por kg de peso. (Wucherpfennig, 1983).

A presença de SO_2 no processo de vinificação é importante, pois auxilia na prevenção do crescimento microbiano e da oxidação do vinho. Neste processo, como em outros, existe um consumo de SO_2 registado ao longo do tempo, resultando em vinhos com pouca proteção.

Devido à importância da sua aplicação, diversas recomendações na sua redução ou substituição por outros aditivos têm sido propostas por algumas instituições internacionais como a FAO, a OMS e o próprio OIV. No entanto, até aos dias de hoje, nenhum outro aditivo apresenta um tão largo espectro de propriedades benéficas na condução da vinificação e na conservação dos vinhos (Curvelo-Garcia, A.S, 1988).

A diminuição do poder redutor nas diferentes formas de SO_2 é a seguinte (Heintze et al., 1974):



A atividade fisiológica do SO_2 nos micro-organismos varia desde a inocuidade até à mais elevada toxicidade, enquanto que a atividade da antimicrobiana em solução do SO_2 surge apenas na presença de água.

As propriedades antissépticas do SO_2 , encontradas nos mostos e nos vinhos, devem-se essencialmente à presença de H_2SO_3 e à grande dependência do pH e temperatura (Beech et al., 1979; Usseglio-Tomasset, 1981; Minarik, 1982; Schopfer e Aerny, 1985); são verificadas igualmente sobre as bactérias responsáveis pela fermentação malolática

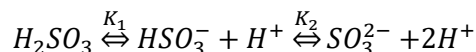
e por diversas doenças bacterianas dos vinhos (géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*), atividade essa também função da natureza destes microrganismos.

O SO₂ responsável pela ativação ou inativação dos complexos enzimáticos - as proteases da uva, que são ativadas por fracas concentrações de SO₂ (não se verifica qualquer efeito notável sobre as enzimas (pectolíticas e glucanases) empregues na vinificação); as enzimas pectolíticas reduzem a sua atividade em cerca de 20% com a adição de 300 mg/dm³ de SO₂ (Schopfer e Aerny, 1985).

O SO₂ é espécie dominante a um pH baixo (responsável por propriedades germicidas). No vinho, o pH que se encontra entre 3,0 e 3,8 tem como espécie principal o anião bissulfito (HSO₃⁻), que age como um antioxidante (Stockley, 2005).

É responsável pelo poder antioxidante e inibidor de enzimas oxidativas que estabiliza os pigmentos antociânicos (que evita ocorrências de diversos acidentes, como por exemplo, o aparecimento de determinadas turvações) e assegura a inibição de uma larga gama de microrganismos (Beech et al., 1979).

O SO₂ pode apresentar-se de diversas formas na presença de mostos e vinhos. Nas formas livres, segundo OIV “anidrido sulfuroso livre” dos mostos e vinhos (doc. OIV 1373/86), este, encontra-se presente nas formas H₂SO₃, HSO₃⁻ e SO₃²⁻, em concentrações estabelecidas pelos seguintes equilíbrios (Curvelo-Garcia, A.S, 1988):



As constantes de equilíbrio K₁ e K₂ são fortemente dependentes da temperatura e determinam o equilíbrio entre as diversas formas de presença em função do pH do meio (Curvelo-Garcia, A.S, 1988):

$$\log \frac{(HSO_3^-)}{(H_2SO_3)} = pH - pK_1$$

$$\log \frac{(SO_3^{2-})}{(HSO_3^-)} = pH - pK_2$$

As reações de combinação do SO₂ resultam principalmente de dois fatores – o pH e a temperatura. Em alguns casos em que as reações são praticamente irreversíveis estas originam o “SO₂ combinado” estável. Nas reações reversíveis, estas originam produtos de combinação mais instável, gerando desta forma uma “reserva” de SO₂ livre cuja libertação progressiva conduz a uma diminuição da fração livre do SO₂ (Curvelo-Garcia, A.S, 1988).

Na medida em que ocorre a diminuição do teor de SO_2 livre, os produtos de combinação vão-se decompondo, dando, assim, origem a iões HSO_3^- de forma a restabelecer o equilíbrio da reação.

Segundo Schopfer e Aerny (1985), as principais causas dos elevados poderes de combinação do SO_2 são as seguintes:

- ✓ Elevados teores de etanal provenientes de uma forte sulfitagem antes da fermentação alcoólica e fermentação alcoólica dirigida por leveduras produtoras de SO_2 ;
- ✓ Elevados teores em produtos de oxidação dos açúcares (5-cetofrutose e ácido 2,5-dicetoglucónico), verificado em vinhos originários de uma matéria prima fortemente alterada;
- ✓ Um défice em tiamina, incitado pela ação de *Botrytis cinérea*, que diminui a capacidade das leveduras para descarboxilar os ácidos pirúvico e 2-cetoglutarico.

1.4.2 O emprego do SO_2 na vinificação e na conservação dos vinhos

Na enologia, a utilização tecnológica do SO_2 é justificada em grande parte pelas suas propriedades antioxidantes e “bloqueamento” dos aldeídos.

Apesar de atualmente existirem diversas alternativas ao seu emprego antisséptico, os elevados custos na utilização dos meios tecnológicos alternativos (pasteurização, filtração estéril, como exemplos) admitem a continuidade da adição do SO_2 - na necessidade de proteger o vinho contra as oxidações e as alterações microbianas ocorridas após a vinificação (30 mg/dm³ de “ SO_2 livre”).

A empregabilidade do SO_2 nos mostos, nos dias de hoje assume um papel secundário como protetor de oxidações indesejáveis; é utilizado sobretudo em face do poder antisséptico da sua fração molecular, sendo a sua ação aproximadamente proporcional ao seu teor (entre 50 e 200 mg/dm³); no entanto, é menos ativo contra as bactérias acéticas do que as bactérias lácticas e as leveduras indesejáveis.

Na vinificação do vinho tinto, o dióxido de enxofre, simplifica a extração da matéria corante e dos taninos, durante o processo de maceração; esta propriedade não se limita apenas a facilitar a extração e dissolução de compostos fenólicos, ácidos orgânicos e sais minerais, como também à destruição das células da película da uva que cederiam assim para o meio os seus constituintes solúveis (Curvelo-Garcia, A.S., 1988).

Nos dias de hoje, verifica-se uma tendência para um nítido abaixamento das doses de SO_2 (60 a 80 mg dm⁻³), devido à evolução da tecnologia, que permite um controlo da

fermentação alcoólica mais completo e de uma matéria-prima mais selecionada sanitariamente. No caso onde as condições são insuficientes, é necessário a utilização de doses bastantes mais elevadas de SO_2 (podendo chegar até 200 mg/dm^3 , caso esteja dentro do parâmetro definido na Tabela 1) – caso verificado quando a podridão cinzenta assume grande importância ou quando o controlo das temperaturas de fermentação é deficiente.

A utilização de uma dose de SO_2 inferior a 50 mg/dm^3 é praticamente inútil na vinificação (Schopfer e Aerny, 1985) podendo dar origem a um risco de refermentação e oxidações indesejáveis. Se as doses forem excessivas, podem provocar uma neutralização do aroma, odor amargo característico na degustação e perda de cor (vinhos tintos).

O dióxido de enxofre adicionado no início da fermentação alcoólica encontra-se praticamente nas formas combinadas, mas, no final da fermentação, parte foi eliminado por evaporação e outra parte por oxidação em sulfatos. Devido ao efeito retardador do “ SO_2 molecular” dado no início da fermentação alcoólica que se repete durante todo o processo, a duração prolonga-se significativamente e diminui as temperaturas alcançadas.

Para se obter uma utilização coerente, é importante ter conhecimento das diversas características do meio, designadamente, a sua capacidade de combinação do SO_2 (Ribéreau-Gayon et al., 1977) - frequentemente é utilizada a regra de que a adição de uma determinada dose de SO_2 a um vinho branco se reparte entre as formas livre e combinada na relação de 2:1.

O nível de “ SO_2 livre” de 30 mg/dm^3 deverá ser verificado periodicamente. Caso se verificar que o teor seja inferior a $20 - 25 \text{ mg/dm}^3$ dever-se-á adicionar nova dose. Nos vinhos doces, os teores de SO_2 livre deverão ser superiores, na ordem de 50 mg/dm^3 .

1.4.3 Limites legais dos teores de dióxido de enxofre

Em grande parte dos países, as diretrizes relativas aos níveis máximos de sulfitos totais permitidos no vinho são rigorosas, estabelecidas com base na segurança de uso e necessidade tecnológica.

Segundo o Jornal Oficial da União Europeia (Europeia, 2009), o teor total de dióxido de enxofre dos vinhos (exceção nos vinhos espumantes e licorosos), quando colocado no mercado para consumo humano direto não pode exceder os 150 mg/l no caso dos vinhos tintos e 200 mg/l no caso dos vinhos brancos e rosados/rosé.

Em Portugal, segundo o IVV (Instituto da Vinha e do Vinho, 2017), os limites estabelecidos para os teores de dióxido de enxofre total dos vinhos produzidos a partir de 19 de Maio de 2017, são:

Tabela 1. Limites analíticos e limites de emprego de dióxido de enxofre total, em bebidas espirituosas (Instituto da Vinha e do Vinho, 2017; Europeia, 2009).

Parâmetro	Limite	Base Jurídica
<i>Vinhos com < 5 g/l de teor em açúcares (expresso em glucose+frutose)</i>		
<i>Vinhos tintos</i>	≤150 mg/l	Reg(CE)nº606/2009 Anexo I B – A.1.a)
<i>Vinhos brancos e rosados</i>	≤200 mg/l	Reg(CE) nº606/2009 Anexo I B – A.1.b)
<i>Vinhos com ≥ 5 g/l de teor em açúcares (expresso em glucose+frutose)</i>		
<i>Vinhos tintos</i>	≤200 mg/l	Reg(CE)nº606/2009 Anexo I B – A.2.a)
<i>Vinhos brancos e rosados</i>	≤250 mg/l	Reg(CE) nº606/2009 Anexo I B – A.2.b)
<i>Vinhos licorosos</i>		
-se teor de açúcares < 5 g/l	≤150 mg/l	Reg(CE) nº606/2009 Anexo I B – B
-se teor de açúcares ≥ 5 g/l	≤200 mg/l	
<i>Vinhos espumantes</i>		
-todas as Categorias vinho espumante qualidade	≤185 mg/l	Reg(CE) nº606/2009 Anexo I B – C
-outros vinhos espumantes	≤235 mg/l	

1.4.4 Método Ripper

O “dióxido de enxofre livre” encontra-se presente nos vinhos e mostos sob diversas formas quimicamente definidas e diferenciadas com teores dependentes de fatores de ordem física e físico-química – o pH, a temperatura e cinética dos diversos equilíbrios estabelecidos (Curvelo-Garcia, A.S.,1988).

Devido ao SO₂ se apresentar sob diversas formas e dependente de fatores de ordem física e química, a determinação analítica é mais complexa, o que leva a associar um novo facto - os diferentes princípios em que se baseiam os diversos métodos analíticos em uso, baseados em propriedades diversificadas e sujeitos a interferências de origem vária.

Os resultados analíticos encontrados apresentam uma relatividade dependente dos métodos utilizados, com um significado que deverá ser sempre associado ao conhecimento dos diversos fatores referidos anteriormente e aos princípios desses métodos (Curvelo-Garcia e San Romão, 1985 a). Os valores obtidos deverão ser compreendidos como referência e não como valores absolutos.

Existem dois métodos internacionalmente reconhecidos para a quantificação de sulfitos livres e totais no vinho ou no mosto (Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, 2006). O método aplicado na Silliker para a análise de sulfitos livres e totais no vinho é o método Ripper (Ripper, 1892), baseado na reação de oxidação de SO_2 com iodo na presença de amido.

O método de Ripper (Ripper, 1892) é menos preciso do que o método Monier-Williams e tem várias desvantagens (Buechsenstein e Ough, 1978); usado como um método rápido estimando a concentração de sulfito no vinho (Iland et al., 2004).

Este método emprega um aparelho (Iodomatic Quéré, Bordeaux- Figura 2) que permite a automatização da titulação do H_2SO_3 pelo iodo.



Figura 2. Iodomatic Quéré, Bordeaux (Latorre, 2017)

“A diferença de potencial necessária à dissociação do iodo é aplicada a um par de elétrodos de platina, imersos na amostra. No final da reação de oxidação, o iodo em excesso é então dissociado, criando-se uma corrente elétrica que vai, por sua vez, comandar uma electroválvula colocada na bureta da solução de iodo titulante. Logo que se verificar o aparecimento dessa corrente elétrica, isto é, logo que a reação de oxidação se complete, a adição da solução de iodo é interrompida. O final da titulação é

determinado com uma sensibilidade da ordem de 0,05 ml de iodo 0,02 N.” (Curvelo-Garcia, A.S., 1988).

O método apresenta uma boa repetibilidade na determinação da fração combinada, quando aplicado à análise de vinhos, sobretudo quando os teores são relativamente elevados (SO_2 total > 50 mg/dm³), sendo, contudo, não aplicável a mostos (Curvelo-Garcia e San Romão, 1985 b).

As dificuldades na obtenção de resultados confiáveis com o método Ripper devem-se, principalmente, a diferenças na interpretação do ponto de viragem em amostras de vinho tinto, devido a variações nas cores desses vinhos e à presença de adutos formados pela ligação entre as antocianinas e os iões bissulfito. Esses adutos se dissociam facilmente em meio ácido e o dióxido de enxofre liberado é titulado como sulfito livre (VAHL & CONVERSE, 1980).

1.5 Determinação do teor de cloretos nos vinhos

1.5.1 A presença de cloretos nos vinhos

O anião cloreto encontra-se presente nos vinhos e a sua concentração está relacionada com a origem geográfica do vinho e condições geológicas e climáticas (Lima & Rangel, 1989); as suas quantidades dependem do grau de maturação da uva, condições climáticas, natureza do solo, condições de vinificação, fermentação, armazenamento e fatores tecnológicos (Cordonnier, 1965).

A presença de cloretos geralmente é de baixa concentração, no entanto esta aumenta quando os vinhos provêm de vinhas localizadas perto da costa; altos níveis de cloreto podem apontar para algumas práticas fraudulentas de filtração, estabilização (Lima & Rangel, 1989), esclarecimento e correção organolética (Leske, Sas, Coulter, Stockley, e Lee, 1997) de vinhos. Para além destes fatores, grandes concentrações no solo do anião cloreto podem afetar a produção de bagas pelas vinhas, pois dificultam a absorção de água pelas plantas (Oliver et al., 2013).

Segundo Walker et al (2003) e Maltman (2013), o vinho contém entre 2 e 4 g L⁻¹ de sais de ácidos minerais e alguns ácidos orgânicos que lhe conferem o gosto de salgado, principalmente os cloretos, que, no entanto, em concentrações moderadas a grandes, pode causar uma reação negativa nos consumidores.

Caso as concentrações dos cloretos transponham certos limites, o vinho não terá permissão para a comercialização em alguns países (SaltySkin: redmostatrisk, 2011).

1.5.2 O emprego dos cloretos na vinificação e na conservação dos vinhos

As diferenças nas características físico-químicas dos vinhos devem-se a diversos fatores, todos relacionados ao solo e às condições climáticas, bem como pelas práticas enológicas utilizadas durante a maturação da uva e o processo de vinificação (Rizzon e Miele; 2011).

O sistema radicular da videira absorve pelo solo os elementos minerais encontrados nas uvas e nos vinhos. Podem ser encontrados sobretudo nas cascas, sementes e parede celular da polpa da uva (Coli, Rangel, Souza, Oliveira, & Chiaradia, 2015).

As fontes limitadas de água são uma possibilidade para o alto teor de sais - altos índices de evaporação e presença de sais dissolvidos na água de irrigação, o que leva a um aumento da salinidade do solo; e consequentemente, ao aumento das concentrações desses sais nos vinhos (Tregeagle *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2010).

Num estudo realizado em amostras de várias partes da Austrália, Leske *et al.* (1997), analisaram a concentração de cloretos e verificaram que uma grande proporção de sumos de uva (1,5% do total de 1214 sumos), dos quais a maioria provenientes de uma região onde a irrigação é classificada como altamente salina, estavam com concentrações de cloretos igual ou acima das permitidas pelo Australian Food Standard Code P4 (Common wealth of Australia, 1997). A elevada concentração de cloretos nos sumos da Austrália deve-se igualmente ao número baixo de vinhedos que utilizavam porta-enxertos de forma a minimizar a absorção de cloretos pelas raízes, enquanto que os países europeus utilizam um número grande de vinhedos (Leske *et al.* ;1997) - este fator explicaria assim a menor concentração de cloretos no vinho nos países europeus, já que alguns porta-enxertos têm a capacidade de restringir a absorção do cloreto.

1.5.3 Limites legais dos teores de cloretos

Em Portugal, segundo o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV), os limites estabelecidos para os cloretos dos vinhos (expresso como cloreto de sódio) produzidos a partir de 26 de Maio de 2017, são:

Tabela 2. Limites estabelecidos para os cloretos dos vinhos (IVV, 2017).

Parâmetro	Limite	Base Jurídica
Vinhos	≤ 1 g/l	Portaria nº 334/94, de 31 de Maio

1.5.4 Método Potenciométrico

A potenciometria, ou método potenciométrico de análise química, é uma técnica útil de caracterização de um ácido (MTB, 2011) e consiste na determinação do ponto final de um processo de titulação por intermédio da medida do pH - onde o ponto de equivalência será revelado pela modificação do mesmo. É traçada uma curva de calibração onde a ordenada corresponde aos valores obtidos da célula EMF (pH) vs. abcissa que corresponde ao volume de titulante adicionado (MTB, 2011).

Na Figura 3 está representada uma montagem do método potenciométrico.



Figura 3. Montagem do método potenciométrico (Escolas, 2017)

Trata-se de um método confiável na aplicação das volumetrias na química analítica quantitativa; utiliza um equipamento simples e relativamente barato, constituído por um eléctrodo de referência, um eléctrodo indicador e um dispositivo para leitura do potencial (potenciómetro); dispensa o uso de indicadores.

É imprescindível um potenciómetro devidamente calibrado, uma vez que é importante que este forneça directamente os valores variáveis do pH à medida que a titulação avança.

Numa titulação potenciométrica, o potencial do eléctrodo indicador é medido em função do volume de titulante adicionado, daí a importância da agitação (VOGEL, 2008).

1.6 Validação de métodos de análise química

De acordo com a NP EN 45020, um método de ensaio corresponde a um procedimento técnico determinado para a realização de um ensaio, que envolve manipulações sujeitas à acumulação de erros (sistemáticos e/ou aleatórios), que em certos casos podem alterar de forma significativa o valor do resultado final.

Numa validação, para corresponderem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida, é importante que os Laboratórios disponham de meios e apresentem critérios objetivos.

Para a validação de métodos internos de ensaio são necessários requisitos mínimos, que dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes critérios: Gama de trabalho/Linearidade; Limiares analíticos (Deteção e Quantificação); Sensibilidade; Precisão; Exatidão.

1.6.1 Linearidade

A linearidade pode ser avaliada por um modelo estatístico (ISO 8466-1) e corresponde à capacidade de um método analítico apresentar, dentro de um intervalo específico, resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ALAP, 2000).

Quando falamos da linearidade da curva de calibração utilizada num determinado método analítico, enquanto caso específico, sabemos que deverá ser avaliada através da sua representação gráfica, juntamente com a análise do coeficiente de correlação (ALAP, 2000).

Um teste de linearidade deve ser corretamente interpretado, uma vez que os coeficientes de correlação, embora sejam bons indicadores de correlação, não significa que sejam de linearidade (ALAP, 2000).

Neste trabalho não é aplicável este critério.

1.6.2 Limiares Analíticos do Método de ensaio

1.6.2.1 Limite de Deteção

O limite de deteção (LD) corresponde à menor concentração de analito que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor exato

(ALAP, 2000), ou seja, usualmente calculado apenas para estabelecer o extremo inferior do intervalo prático de operação do método.

Numa técnica analítica, o limite de deteção pode ser determinado por 3 processos: avaliação visual; relação sinal/ruído; e método, baseado em parâmetros da curva de calibração.

Se da análise se obtiver uma leitura inferior ao limite de deteção, não significa que haja ausência do analito a medir. Pode-se, na verdade, afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor (ALAP, 2000).

Para o estudo destas validações o limite de deteção será determinado pela seguinte fórmula:

Equação 1. Cálculo do Limite de Deteção

$$\text{Limite de deteção (LD)} = \frac{\text{Limite de Quantificação (LQ)}}{3}$$

1.6.2.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é referente à menor quantidade do analito que pode ser detetada numa amostra determinada, com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ALAP, 2000). Para a sua análise deve-se utilizar pelo menos 5 padrões independentes e, numericamente, é determinado através do cálculo do coeficiente de variação, sendo que, segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação para estes padrões (desvio padrão a dividir pela média dos valores encontrados) não deve exceder 10%.

1.6.3 Sensibilidade

A sensibilidade é o princípio que avalia a capacidade de um método ou equipamento destrinçar pequenas diferenças de concentração num analito. Esta pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido (ΔL) e a variação da concentração (ΔC) correspondente àquele acréscimo (ALAP, 2000).

O conceito de sensibilidade, associado à magnitude do sinal, não deve ser confundido com o limite de deteção, associado à capacidade de resolução do sinal) (ALAP, 2000). Neste trabalho não é aplicável este critério.

1.6.4 Precisão

A precisão corresponde a uma medida de dispersão que caracteriza os valores analíticos em redor da sua média. A sua avaliação passa pelo estudo da repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (ALAP, 2000).

A validação dos métodos abordados neste trabalho será apenas estimada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

1.6.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade consiste na precisão de um método de ensaio efetuado em condições de ensaio semelhantes, ou seja, os ensaios são efetuados para uma certa e determinada amostra, analisados pelo mesmo analista e laboratório, num igual curto intervalo de tempo, procedimento de medição e instrumentação (ALAP, 2000).

Na probabilidade de ser efetuado o estudo da repetibilidade no próprio laboratório, é necessário a realização de uma série de medições ($n > 10$), sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade (ALAP, 2000).

Para o estudo da repetibilidade nos diferentes métodos analisados, serão efetuadas oito repetições sobre seis amostras diferentes de vinho (Branco, Tinto, Rosé, Porto, Sangria e Espumante) pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, no mesmo equipamento e num curto espaço de tempo (no mesmo dia). Determinar-se-á o limite de repetibilidade para cada tipo de amostra, que corresponde ao valor abaixo do qual se deve situar a diferença entre dois resultados.

1.6.4.1.1 Teste de Grubbs

Para verificar a consistência dos resultados obtidos, procede-se ao emprego do teste de Grubbs (ISO Standards Handbook; 1995), que avalia o valor mínimo e máximo obtido em cada amostra. Este teste é desenvolvido para verificar a presença de valores extremos em observações amostrais e é calculado da seguinte forma:

Equação 2. Cálculo do Teste de Grubbs

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s}$$

dado que:

x_i : é uma observação da amostra x_1, x_2, \dots, x_n ;

\bar{x} : é a média amostral;

s : é o desvio padrão amostral.

1.6.4.1.2 Teste C de Cochran

Para comparar a maior variância com as outras variâncias de um grupo é utilizado o teste de Cochran que é calculado pela seguinte formula:

Equação 3. Cálculo do Teste C de Cochran

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^P S_i^2}$$

Compara-se o valor calculado C com os valores críticos tabelados (C_c) num teste de 1% ou 5% de significância. A decisão tomada segue o seguinte critério:

- se $C < C_c$ (no nível de significância de 5%) → aceita-se a hipótese nula
- se $C_c (1\%) > C > C_c (5\%)$ → situação suspeita
- se $C > C_c (1\%)$ → rejeita-se a hipótese nula

1.6.4.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia compreende a avaliação da influência de variações dentro do mesmo laboratório, em diferentes dias, com distintos analistas e/ou díspares equipamentos. Está sujeito a maior variabilidade, e, como tal, é considerada como uma medida mais representativa dos resultados a serem observados, durante a utilização do método na rotina. Efetuam-se por isso, n medições em replicado, duplicado ou ensaio único, sobre a amostra em condições pré-definidas.

Para a validação dos métodos abordados ao longo do trabalho será realizado um estudo da precisão intermédia que consiste na análise de seis amostras de vinho (Branco, Tinto, Rosé, Porto, Sangria e Espumante). O estudo será efetuado em duplicado, pelo mesmo analista e equipamento, variando o dia de análise.

A componente de incerteza associada à precisão dos resultados (erros aleatórios), será avaliada através do desvio-padrão de precisão intermédia determinada, obtido a partir do desvio padrão de resultados replicados de uma amostra ou padrão:

Equação 4. Cálculo da Incerteza

$$u_{prec} = \frac{S}{\bar{x}}$$

sendo S o desvio padrão dos resultados dos padrões e \bar{x} a sua média.

1.6.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade trata-se de um método de análise em que os resultados são obtidos a partir de ensaios interlaboratoriais, que utiliza o mesmo método e amostra, sob condições diferentes, como operador, local e equipamentos (ALAP, 2000).

Este estudo é exigido em metodologias oficiais.

Neste trabalho não é aplicável este critério.

1.6.5 Exatidão

A exatidão de um método corresponde à capacidade de um método analítico obter resultados mais próximos do valor real ou verdadeiro, sendo este afetado por erros sistemáticos (ALAP).

Quando aplicado a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos.

Para avaliar a exatidão de uma metodologia, são utilizados processos como materiais de Referência Certificados, ensaios Interlaboratoriais e testes comparativos (ALAP).

Neste trabalho, a exatidão será avaliada através de ensaios interlaboratoriais realizados ao longo dos últimos anos (entre 2012-17), sendo requisito da entidade acreditadora (IPAC), que este plano seja efetuado de modo a prever a participação em cada método de ensaio e cada matriz acreditada, pelo menos uma vez por ciclo de acreditação. Além disso, o IPAC estabeleceu como requisito necessário para acreditação de novos métodos, a participação em, pelo menos, um ensaio interlaboratorial, promovido por uma entidade reconhecida, com desempenho satisfatório, ou seja, com z-score <2 (Norma ISO/IEC 17043).

2. Execução experimental

2. Execução experimental

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos experimentais necessários, assim como o tratamento do material utilizado para a determinação dos teores de anidrido sulfuroso livre e total e cloretos.

A seleção destes métodos de ensaio, assim como amostragem (recolha de forma representativa de amostras (substâncias, materiais ou produtos)), foi escolhida tendo em vista o tempo previsto para a realização destes e, simultaneamente, a correta adequação ao trabalho a realizar. A escolha recaiu sobre métodos publicados em normas portuguesas que, por estarem em vigor, mas desatualizadas em termos de equipamento, sofreram algumas reformulações.

As amostras foram acondicionadas ao abrigo da luz

2.1 Método da determinação de teores de anidrido sulfuroso livre e total

A determinação qualitativa e quantitativa de anidrido sulfuroso livre e total foi efetuada com base na norma portuguesa NP 2220/1987.

2.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a elaboração destes métodos foram os seguintes:

- ✓ Solução de ácido sulfúrico 1/3 (V/V), (H_2SO_4 , $\rho=1,84 \text{ g/cm}^3$)
- ✓ Solução de ácido sulfúrico 1/10 (V/V), (H_2SO_4 , $\rho=1,84 \text{ g/cm}^3$)
- ✓ Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 2 N.
- ✓ Solução de KI KIO_3 a 0,02 N (N/50). A solução encontra-se disponível no comércio, na concentração desejada (LDS-Laboratoires Dujardin-Salleron) e deve ser guardada refrigerada.

Todos os reagentes utilizados referem ao mesmo lote e foram acondicionados em locais ao abrigo da luz.

2.1.2 Material e instrumentação

Na preparação das amostras, além do material de uso corrente no laboratório, foi utilizado um equipamento de IODO 980, gobelé de 50 ml de forma baixa e pipetas volumétricas de volume variável.

Todo o equipamento foi devidamente lavado, limpo e seco antes de cada utilização.

2.1.3 Procedimento experimental

✓ Anidrido sulfuroso livre

Para a realização deste método pipetou-se 25 ml de amostra para um gobelé e de seguida, com outra pipeta adicionou-se 5 ml da solução H_2SO_4 1/3 (V/V). Ligou-se o aparelho de iodo e mergulhou-se o eletrodo para proceder ao doseamento. No final leu-se o volume de solução na bureta.

✓ Anidrido sulfuroso total

Para a realização deste método pipetou-se 10 ml de amostra para um gobelé e de seguida, com outra pipeta adicionou-se 2 ml de solução de NaOH. Deixou-se repousar durante 5 minutos e pipetou-se 20 ml da solução de ácido sulfúrico 1/10 (V/V). Ligou-se o aparelho de iodo e mergulhou-se o eletrodo e procedeu-se ao doseamento. No final leu-se o volume de solução na bureta.

2.2 Método da determinação do teor de cloretos (método potenciométrico)

A determinação qualitativa e quantitativa de cloretos foi efetuada com base na norma portuguesa NP 2226/1988.

2.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a elaboração deste método foram os seguintes:

- ✓ Ácido nítrico ($\rho_{20}=1,40 \text{ g/cm}^3$)
- ✓ Solução-padrão de cloretos
- ✓ Solução-padrão de nitrato de prata

Todos os reagentes utilizados referem ao mesmo lote e foram acondicionados em locais ao abrigo da luz.

2.2.2 Material e Instrumentação

Na preparação das amostras, além do material de uso corrente no laboratório, foi utilizado um agitador magnético, uma balança analítica, capaz de pesar com a aproximação de 0,0001 g, um eléctrodo Ag/AgCl e um eléctrodo de sulfato mercurioso (referência) ou eléctrodo combinado (Ag/AgCl referência), exsiccador e potenciómetro com escala graduada, pelo menos de 2 em 2mV.

Todo o equipamento foi devidamente lavado, limpo e seco antes de cada utilização.

2.2.3 Procedimento experimental

2.2.3.1 Preparação de soluções

✓ Solução-padrão de cloretos

Pesar 2,1027 g de cloreto de potássio (com max. 0,005 % de bromo), pesados com precisão de 0,0001 g, previamente seco durante alguns dias no exsiccador, contendo substância exsicante adequada.

Introduzir para um balão marcado de precisão de 1000 ml, dissolver em água e perfazer o volume.

✓ Solução-padrão de nitrato de prata

Num balão volumétrico de 1000 ml, introduzir 4,7912 g de nitrato de prata, previamente seco, pesados com precisão de 0,0001 g, dissolver em solução alcoólica a 10 % (V/V) e perfazer o volume.

2.2.3.2 Preparação das amostras

Deve-se efetuar duas determinações em paralelo.

2.2.3.2.1 Determinação do potencial do ponto equivalente

Sob agitação adicionar 5 ml da solução padrão de cloretos para um gobelé. Juntar 95 ml de água e 1 ml de ácido nítrico. Introduzir os elétrodo no gobelé e com agitação moderada adicionar a solução de nitrato de prata. As adições são realizadas da seguinte forma: 1- 4 ml em frações de 1ml; 4,2 - 4,8 ml em frações de 0,2 ml; 4,9 - 5,4 ml em frações de 0,1 ml; 5,6 - 6 ml em frações de 0,2 ml; 7 - 10 ml em frações de 1 ml. No fim de cada adição aguardar 30 s antes de efetuar a leitura dos mV correspondentes.

2.2.3.2.2 Verificação do potencial do ponto de equivalência

Sob agitação adicionar 5 ml da solução padrão de cloretos para um gobelé. Juntar 95 ml de água e 1 ml de ácido nítrico. Introduzir os elétrodo no gobelé e com agitação moderada adicionar a solução de nitrato de prata. Mergulhar os elétrodo e titular com agitação até obtenção do potencial do ponto equivalente. Repetir a operação até obter concordância dos resultados.

2.2.3.2.3 Determinação do potencial do ponto de equivalência da amostra

Num gobelé adicionar 50 ml de bebida, 50 ml de água e 1 ml de ácido nítrico. Titular como indicado na verificação do potencial do ponto de equivalência.

3. Resultados obtidos e discussão

3. Resultados obtidos e discussão

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos no decorrer do presente trabalho para a determinação do teor de anidrido sulfuroso livre e total e teor de cloretos. Tanto num caso como no outro, procedeu-se à análise de diferentes características, sendo apresentados neste capítulo apenas os resultados para os diferentes tipos de vinho.

Posteriormente, são apresentados os resultados obtidos para a validação das metodologias analíticas.

As amostras para este trabalho foram escolhidas tendo em conta os diferentes tipos de vinhos existentes à disposição do consumidor. Neste trabalho foram estudados seis tipos de amostras de vinho:

- ✓ Branco
- ✓ Tinto
- ✓ Rosé
- ✓ Porto
- ✓ Sangria
- ✓ Espumante

3.1 Validação do método analítico para a determinação do teor de anidrido sulfuroso livre

A determinação dos teores anidrido sulfuroso livre foi realizada por iodometria.

Para a validação dos resultados analíticos, foram realizados estudos dos limiares analíticos, da precisão e da exatidão.

3.1.1 Limiares analíticos

O limite de quantificação (LQ) do método foi determinado com base na fórmula:

Equação 5. Limite de Quantificação do Anidrido Sulfuroso Livre (NP 2220/1987)

$$LQ(\text{Anidrido sulfuroso livre}) = V_1 \times 25,6$$

Sendo que, o V_1 corresponde ao volume mínimo da solução de KI KIO_3 gasto na titulação (anidrido sulfuroso livre), expresso em mililitros, que se pode gastar num ensaio. O teor de anidrido sulfuroso livre é expresso em mg/l.

Na Tabela 3 é apresentado o valor do limite de quantificação **(1.6.2.1.2)** e deteção **(1.6.2.1.1)** para o método do anidrido sulfuroso livre.

Tabela 3. Valor do limite de quantificação e deteção obtido para a determinação do teor de anidrido sulfuroso livre

	Limite de Quantificação (LQ) (mg/l)	Limite de Deteção (LD) (mg/l)
<i>Anidrido Sulfuroso livre</i>	5,12	1,71

3.1.2 Precisão

A precisão deste trabalho foi estimada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

3.1.2.1 Repetibilidade

Na Tabela 4 são representados os resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade **(1.6.4.1)**.

Tabela 4. Estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso livre

Estudo da repetibilidade													
Amostra	Ensaio 1 (ml)	Ensaio 2 (ml)	Ensaio 3 (ml)	Ensaio 4 (ml)	Ensaio 5 (ml)	Ensaio 6 (ml)	Ensaio 7 (ml)	Ensaio 8 (ml)	Média (ml)	Variância (s²)	Desvio padrão (s)	Desvio padrão relativo (%)	Limite da repetibilidade (ml/l)
<i>Branco</i>	1,90	1,90	1,90	1,80	1,75	1,95	1,90	1,80	1,86	0,0048	0,0694	3,7281	0,1944
<i>Rosé</i>	1,25	1,25	1,35	1,30	1,30	1,20	1,20	1,25	1,26	0,0027	0,0518	4,0994	0,1449
<i>Porto</i>	0,40	0,35	0,40	0,40	0,45	0,35	0,30	0,35	0,38	0,0021	0,0463	12,3443	0,1296
<i>Sangria</i>	0,25	0,25	0,20	0,15	0,20	0,20	0,15	0,20	0,20	0,0014	0,0378	18,8982	0,1058
<i>Espumante</i>	0,40	0,40	0,35	0,35	0,30	0,45	0,40	0,35	0,38	0,0021	0,0463	12,3443	0,1296

(ver anexo 2)

3.1.2.1.1 Teste de Grubbs

Na seguinte tabela encontram-se os resultados obtidos para o teste de Grubbs (1.6.4.1.1) das diferentes amostras de vinho.

Tabela 5. Resultados obtidos para o teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso livre

TESTE DE GRUBBS

<i>Amostra</i>	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
<i>Branco</i>	2,274	1,75	1,620	Aceitável	1,95	1,260	Aceitável
<i>Rosé</i>	2,274	1,20	1,208	Aceitável	1,35	1,691	Aceitável
<i>Porto</i>	2,274	0,30	1,620	Aceitável	0,45	1,620	Aceitável
<i>Sangria</i>	2,274	0,15	1,323	Aceitável	0,25	1,323	Aceitável
<i>Espumante</i>	2,274	0,30	1,620	Aceitável	0,45	1,620	Aceitável

A análise aos valores mínimos e máximos de cada amostra indica a inexistência de resultados discrepantes, uma vez que o valor obtido de G experimental é inferior ao valor crítico para um nível de significância de 1% (ver anexo 1 e 2).

3.1.2.1.2 Teste C de Cochran

Na Tabela 6 estão representados os resultados obtidos para o teste C de Cochran (1.6.4.1.2) na determinação do teor de anidrido sulfuroso livre.

Tabela 6. Resultados obtidos para o teste C de Cochran na determinação do teor de anidrido sulfuroso livre

Teste C de Cochran

<i>Numero de matrizes</i>	5
<i>Maior Variância</i>	0,005
<i>C de Cochran (calculado)</i>	0,363
<i>Valor crítico tabelado - C_c (5 %)</i>	0,4241
<i>Avaliação</i>	$CC_{calc} < C_{tab} 5\%$
<i>Valor do limite da repetibilidade (média dos resultados da coluna "Limite da repetibilidade")</i>	0,140879134
<i>Conclusão</i>	Valor aceite

O valor crítico para $k = 5$ (para 5% de significância) é igual a 0,4241 (tabelado). O valor calculado (0,353) é menor que o valor tabelado, assim conclui-se que o valor calculado é menos variável, isto é, mais preciso (ver anexo 1 e 2).

3.1.2.2 Precisão Intermédia

Nas Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9, Tabela 10, Tabela 11 e Tabela 12 encontram-se registados os resultados obtidos para a avaliação da precisão intermédia (**1.6.4.2**) da determinação de anidrido sulfuroso livre em amostras de vinho (Branco, Tinto, Rosé, Porto, Sangria e Espumante).

Tabela 7. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho Branco

<i>Data</i>	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,6	1,85
12/04/2017	1,95	1,85
18/04/2017	1,65	1,4
19/04/2017	1,5	1,55
20/04/2017	1,6	1,6
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,12	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	19,8	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,07	

A concentração média de anidrido sulfuroso livre na amostra de vinho Branco apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,12 um limite da precisão intermédia de 19,8 % e uma incerteza de medição de 0,07 ml.

Tabela 8. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho Tinto

<i>Data</i>	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,15	1,15
12/04/2017	1,05	1
18/04/2017	1,2	1,25
19/04/2017	1,15	1,1
20/04/2017	1,15	1,2
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,03	

<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	7,8
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,03

A concentração média de anidrido sulfuroso livre na amostra de vinho Tinto apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,03 um limite da precisão intermédia de 7,8 % e uma incerteza de medição de 0,03 ml.

Tabela 9. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho Rosé

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1	1
12/04/2017	1	0,95
18/04/2017	0,9	0,95
19/04/2017	1,05	0,95
20/04/2017	1,05	1,05
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,04	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	11,0	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,04	

A concentração média de anidrido sulfuroso livre na amostra de vinho Rosé apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,04 um limite da precisão intermédia de 11,0 % uma incerteza de medição de 0,04 ml.

Tabela 10. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de vinho do Porto

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	0,35	0,3
12/04/2017	0,3	0,25
18/04/2017	0,35	0,3
19/04/2017	0,25	0,2
20/04/2017	0,35	0,25
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,04	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	43,2	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,15	

A concentração média de anidrido sulfuroso livre na amostra de vinho do Porto apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,04 um limite da precisão intermédia de 43,2 % uma incerteza de medição de 0,15 ml.

Tabela 11. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de Sangria

Data	Ensaio A	Ensaio B
10/04/2017	0,35	0,3
12/04/2017	0,3	0,35
18/04/2017	0,35	0,35
19/04/2017	0,25	0,3
20/04/2017	0,25	0,25
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,03	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	25,1	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,09	

A concentração média de anidrido sulfuroso livre na amostra de Sangria apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,03 um limite da precisão intermédia de 25,1 % uma incerteza de medição de 0,09 (ml).

Tabela 12. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso livre numa amostra de Espumante

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	0,45	0,4
12/04/2017	0,35	0,3
18/04/2017	0,3	0,3
19/04/2017	0,3	0,3
20/04/2017	0,25	0,3
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,03	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	23,6	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,08	

A concentração média de anidrido sulfuroso livre na amostra de Espumante apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,03 um limite da precisão intermédia de 23,6 % uma incerteza de medição de 0,08 (ml).

3.1.3 Exatidão

Os resultados finais obtidos da exatidão **(1.6.5)** para a determinação do anidrido sulfuroso livre são apresentados nas Tabela 13, Tabela 14 e Tabela 15.

Tabela 13. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ < 10 na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso livre

Matriz	Data	Valor obtido	Valor alvo	Incerteza padrão	Desvio padrão robusto	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de resultados	z-score
<i>Port wines</i>	jan/12	8	7	2	4	15	0	9	0,25
<i>Red Porto</i>	fev/12	6	6	1	3	12	0	10	0,00
<i>White Porto</i>	mar/12	9	6	2	4	14	0	9	0,75
<i>Red Porto</i>	mai/12	6	7	1	2	11	3	10	-0,50
<i>White Porto</i>	nov/12	10	6	1	3	12	0	8	1,33
<i>Red Porto</i>	jan/13	8	6	1	2	10	2	6	1,00
<i>Red Porto</i>	fev/13	8	7	1	3	13	1	8	0,33
<i>Red Porto</i>	mai/13	10	7	2	3	13	1	6	1,00
<i>Red Porto</i>	out/13	10	7	1	2	11	3	9	1,50
<i>Red Port</i>	mai/14	9	8	1	3	14	2	9	0,33
<i>White Wine</i>	jun/14	42	34	1	4	46	22	75	1,33
<i>Rosé Port</i>	fev/15	8	8	2	4	16	0	8	0,00
<i>White Port</i>	mar/15	6	7	1	4	15	0	9	-0,25
<i>Red Port</i>	out/15	9	8	2	3	14	2	6	0,33

Tabela 14. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ (20-40) na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso livre

Matriz	Data	Valor obtido	Valor alvo	Incerteza padrão	Desvio padrão robusto	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de resultados	z-score
White wine	jan/12	24	24	0	3	34	14	73	0
Red wine	fev/12	15	15	1	4	23	7	63	0
White wine	mar/12	31	34	1	5	46	22	70	-0,6
White wine	mai/12	31	31	1	5	42	20	72	0
Red Porto	out/12	15	8	2	4	16	0	8	1,75
White wine	out/12	32	25	1	4	35	15	69	1,4
Sparkling wine	nov/12	23	15	1	4	23	7	54	2
Dry rosé wine	nov/12	22	14	0	3	22	6	59	2
White wine	jan/13	28	28	1	4	39	17	78	0
Sparkling wine	fev/13	23	23	1	4	33	13	59	0
White wine	mai/13	26	20	0	3	29	11	74	1,2
Red wine	set/13	18	15	1	4	23	7	56	0,75
Rosé Port	fev/14	13	9	1	3	15	3	10	1,33
Red wine	fev/14	22	20	0	4	29	11	81	0,4
White wine	mar/14	24	27	1	7	37	17	69	-0,6
Red wine	set/14	20	20	1	7	29	11	61	0
White wine	out/14	23	16	0	3	24	8	75	1,75

White wine	jan/15	20	15	1	4	23	7	66	1,25
Red Port	jan/15	13	10	2	4	18	2	9	0,75
Sparkling wine	fev/15	22	16	0	2	24	8	64	1,5
Red wine	abr/16	20	21	1	5	30	12	67	-0,2
White wine	jan/17	24	22	1	3	31	13	72	0,4

Tabela 15. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ > 40 na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso livre

Matriz	Data	Valor obtido	Valor alvo	Incerteza padrão	Desvio padrão robusto	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de resultados	z-score
Sparkling wine	jan/12	44	37	1	8	49	25	60	0,88
Naturally sweet wine	fev/12	41	43	1	5	57	29	66	-0,40
White Wine	jun/14	42	34	1	4	46	22	75	1,33

A avaliação da exatidão do método com base na participação em EIL, permite concluir que se trata de métodos exatos, uma vez que os valores de z-score obtidos são todos inferiores a 2 (ver anexo 3).

3.2 Validação do método analítico para a determinação do teor de anidrido sulfuroso total

A determinação dos teores anidrido sulfuroso total foi realizada por iodometria. Para a validação dos resultados analíticos, foram realizados estudos dos limiares analíticos, da precisão e da exatidão.

3.2.1 Limites analíticos

O limite de quantificação (LQ) do método foi determinado com base na fórmula:

Equação 6. Limite de Quantificação do Anidrido Sulfuroso Total (NP 2220/1987)

$$LQ (\text{Anidrido sulfuroso total}) = V_2 \times 64$$

Sendo que o V_2 corresponde ao volume mínimo da solução de KI KIO_3 gasto na titulação (anidrido sulfuroso total), expresso em mililitros, que se pode gastar num ensaio. O teor de anidrido sulfuroso total é expresso em mg/l.

Na Tabela 16 é apresentado o valor do limite de quantificação (1.6.2.1.2) e deteção (1.6.2.1.1) para o método do anidrido sulfuroso total.

Tabela 16. Valor do limite de quantificação e deteção obtido para a determinação do teor de anidrido sulfuroso total

	Limite de Quantificação (LQ) (mg/l)	Limite de Deteção (LD) (mg/l)
<i>Anidrido Sulfuroso Total</i>	12.8	4,27

3.2.2 Precisão

A precisão deste trabalho foi estimada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

3.2.2.1 Repetibilidade

Na Tabela 17 são representados os resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade (1.6.4.1).

Tabela 17. Estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso total

<i>Amostra</i>	Estudo da repetibilidade												
	Ensaio 1 (ml)	Ensaio 2 (ml)	Ensaio 3 (ml)	Ensaio 4 (ml)	Ensaio 5 (ml)	Ensaio 6 (ml)	Ensaio 7 (ml)	Ensaio 8 (ml)	Média (ml)	Variância (s ²)	Desvio padrão (s)	Desvio padrão relativo (%)	Limite da repetibilidade (ml/l)
<i>Branco</i>	1,75	1,80	1,90	1,65	1,80	1,75	1,75	1,80	1,77	0,0050	0,0707	3,9837	0,1980
<i>Tinto</i>	1,40	1,55	1,55	1,45	1,50	1,50	1,45	1,55	1,49	0,0032	0,0563	3,7690	0,1576
<i>Rosé</i>	1,80	1,85	1,85	1,80	1,75	1,85	1,75	1,85	1,81	0,0020	0,0443	2,4453	0,1241
<i>Porto</i>	0,80	0,85	0,90	0,85	0,90	0,95	0,70	0,80	0,84	0,0060	0,0776	9,2009	0,2174
<i>Sangria</i>	0,55	0,50	0,50	0,45	0,45	0,55	0,50	0,55	0,51	0,0017	0,0417	8,2422	0,1168

(ver anexo 2)

3.2.2.1.1 Teste de Grubbs

Na seguinte tabela encontram-se os resultados obtidos para o teste de Grubbs (1.6.4.1.1) das diferentes amostras de vinho.

Tabela 18. Resultados obtidos para o teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso total

TESTE DE GRUBBS

Amostra	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
<i>Branco</i>	2,274	1,65	1,768	Aceitável	1,90	1,768	Aceitável
<i>Tinto</i>	2,274	1,40	1,665	Aceitável	1,55	0,999	Aceitável
<i>Rosé</i>	2,274	1,75	1,410	Aceitável	1,85	0,846	Aceitável
<i>Porto</i>	2,274	0,70	1,852	Aceitável	0,95	1,369	Aceitável
<i>Sangria</i>	2,274	0,45	1,348	Aceitável	0,55	1,049	Aceitável

A análise aos valores mínimos e máximos de cada amostra indica a inexistência de resultados discrepantes, uma vez que o valor obtido de G experimental é inferior ao valor crítico para um nível de significância de 1% (ver anexo 1 e 2).

3.2.2.1.2 Teste C de Cochran

Na Tabela 19 estão representados os resultados obtidos para o teste C de Cochran (1.6.4.1.2) na determinação do teor de anidrido sulfuroso total.

Tabela 19. Resultados obtidos para o teste C de Cochran na determinação do teor de anidrido sulfuroso total

Teste C de Cochran

<i>Numero de matrizes</i>	5
<i>Maior Variância</i>	0,006
<i>C de Cochran (calculado)</i>	0,335
<i>Valor crítico tabelado - C_c (5 %)</i>	0,4241
<i>Avaliação</i>	CCalc < Ctab5%
<i>Valor do limite da repetibilidade (média dos resultados da coluna "Limite da repetibilidade")</i>	0,162785866
<i>Conclusão</i>	Valor aceite

O valor critico para k = 5 (para 5% de significância) é igual a 0,4241(tabelado). O valor calculado (0,335) é menor que o valor tabelado, assim conclui-se que o valor calculado é menos variável, isto é, mais preciso (ver anexo 1 e 2).

3.2.2.2 Precisão Intermédia

Nas tabelas seguintes encontram-se registados os resultados obtidos para a avaliação da precisão intermédia (1.6.4.2) da determinação de anidrido sulfuroso total em amostras de vinho (Branco, Tinto, Rosé, Porto, Sangria e Espumante).

Tabela 20. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho Branco

<i>Data</i>	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,5	1,4
12/04/2017	1,75	1,6
18/04/2017	1,65	1,6
19/04/2017	1,55	1,7
20/04/2017	1,7	1,7
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,08	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	13,1	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,05	

A concentração média de anidrido sulfuroso total na amostra de vinho Branco apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,08 um limite da precisão intermédia de 13,1 % e uma incerteza de medição de 0,05 ml.

Tabela 21. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho Tinto

<i>Data</i>	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,05	1,1
12/04/2017	1,4	1,35
18/04/2017	1,3	1,25
19/04/2017	1,35	1,3
20/04/2017	1,35	1,45
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,04	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	9,7	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,03	

A concentração média de anidrido sulfuroso total na amostra de vinho Tinto apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,04 um limite da precisão intermédia de 9,7 % e uma incerteza de medição de 0,03 (ml).

Tabela 22. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho Rosé

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,2	1,2
12/04/2017	1,65	1,65
18/04/2017	1,55	1,45
19/04/2017	1,5	1,45
20/04/2017	1,45	1,4
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,04	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	7,5	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,03	

A concentração média de anidrido sulfuroso total na amostra de vinho Rosé apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,04 um limite da precisão intermédia de 7,5 % e uma incerteza de medição de 0,03 (ml).

Tabela 23. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de vinho do Porto

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	0,7	0,7
12/04/2017	0,9	0,85
18/04/2017	1,1	1
19/04/2017	0,75	0,95
20/04/2017	1	0,9
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,08	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	25,0	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,09	

A concentração média de anidrido sulfuroso total na amostra de vinho do Porto apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,08 um limite da precisão intermédia de 25,0 % e uma incerteza de medição de 0,09 ml.

Tabela 24. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de Sangria

Data	Ensaio A	Ensaio B
10/04/2017	0,5	0,55
12/04/2017	0,5	0,55
18/04/2017	0,45	0,5
19/04/2017	0,5	0,5
20/04/2017	0,4	0,45
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,03	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	18,1	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,06	

A concentração média de anidrido sulfuroso total na amostra de Sangria apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,03 um limite da precisão intermédia de 18,1 % e uma incerteza de medição de 0,06 (ml).

Tabela 25. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de anidrido sulfuroso total numa amostra de Espumante

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	2,8	2,75
12/04/2017	2,85	2,65
18/04/2017	2,8	2,9
19/04/2017	2,7	2,7
20/04/2017	2,75	2,7
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,07	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	7,5	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,03	

A concentração média de anidrido sulfuroso total na amostra de Espumante apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,07 um limite da precisão intermédia de 7.5% e uma incerteza de medição de 0,03 ml.

3.2.3 Exatidão

Os resultados finais da exatidão (**1.6.5**) para a determinação do anidrido sulfuroso total são apresentados nas. Tabelas 26 e 27

Tabela 26. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ < 40 na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso total

Matriz	Data	Valor obtido	Valor alvo	Incerteza padrão	Desvio padrão robusto	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de resultados	z-score
Red Porto	fev/13	19	19	3	8	34	4	12	0,00
Red Porto	mai/12	38	39	3	9	54	24	13	-0,11
Red Porto	mai/13	32	33	4	10	48	18	10	-0,13
Red Port	fev/15	38	26	3	8	41	11	10	1,50
Rosé Port	out/15	29	43	7	19	64	22	12	-1,27
Red Port	fev/16	38	34	4	8	49	19	7	0,50

Tabela 27. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ > 40 na análise da exatidão para o método de anidrido sulfuroso total

Matriz	Data	Valor obtido	Valor alvo	Incerteza padrão	Desvio padrão robusto	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de resultados	z-score
Port wines	jan/12	48	55	5	15	70	40	12	-0,47
Sparkling wine	jan/12	160	159	2	11	182	136	60	0,09
Red wine	fev/12	58	63	2	10	81	45	63	-0,50
Red Porto	fev/12	42	38	4	10	53	23	12	0,40
Red Porto	fev/12	42	38	4	10	53	23	12	0,40
White Porto	mar/12	58	51	3	7	66	36	11	1,00
White wine	mar/12	102	97	1	7	117	77	67	0,71
White wine	mai/12	115	110	1	8	130	90	80	0,63
Red wine	set/12	70	56	2	12	74	38	52	1,56
Red Porto	out/12	83	73	3	9	88	58	11	1,25
White Porto	nov/12	51	43	2	5	58	28	10	1,00
Dry rosé wine	nov/12	83	74	1	8	93	55	67	0,90
Sparkling wine	nov/12	128	118	1	9	139	97	55	0,91
Red Porto	jan/13	48	40	5	12	55	25	10	1,00
White wine	jan/13	144	136	1	9	158	114	77	0,73
Sparkling wine	fev/13	134	123	2	10	144	102	61	1,00
Aromatized wine	mai/13	99	97	1	8	117	77	55	0,20
Sparkling wine	mai/13	179	182	3	16	206	158	53	-0,25
White wine	jun/13	115	98	1	7	118	78	75	1,70
Red wine	set/13	45	39	2	11	56	22	55	0,67
Red Porto	out/13	64	58	2	6	73	43	12	0,75
White wine	out/13	141	123	2	12	144	102	60	1,64
Sparkling wine	nov/13	118	103	1	8	123	83	76	1,50

Dry rosé wine	nov/13	138	129	2	12	150	108	86	0,82
Red wine	fev/14	74	76	1	9	95	57	90	-0,20
Rosé Port	fev/14	115	102	3	9	117	87	12	1,63
White Port	mar/14	51	52	3	8	67	37	11	-0,13
White wine	mar/14	131	118	2	11	139	97	87	1,18
Red Port	mai/14	45	45	2	5	60	30	12	0,00
White Wine	jun/14	109	93	1	9	113	73	69	1,60
Red wine	set/14	61	58	3	17	76	40	61	0,33
Red Port	out/14	64	52	2	6	67	37	10	1,50
White wine	jan/15	83	73	1	7	92	54	65	1,00
Sparkling wine	fev/15	112	95	1	9	115	75	61	1,70
White Port	mar/15	58	57	2	6	72	42	10	0,13
Red wine	abr/16	70	75	2	10	94	56	64	-0,50
White wine	jan/17	106	88	1	6	107	69	70	1,80

A avaliação da exatidão do método com base na participação em EIL permite concluir que se trata de métodos exatos, uma vez que os valores de z-score obtidos são todos inferiores a 2 (ver anexo 3).

3.3 Validação do método analítico para a determinação do teor de cloretos

A determinação do teor dos cloretos foi realizada por potenciometria.

Para a validação dos resultados analíticos, foram realizados estudos dos limiares analíticos, da precisão e da exatidão.

3.3.1 Limites analíticos

O limite de quantificação do método foi determinado com base na fórmula:

Equação 7. Limite de Quantificação dos Cloretos (NP 2226/1988)

$$\text{Limite de Quantificação (cloretos)} = 20V_3,$$

Sendo que, o V_3 corresponde mínimo da solução de nitrato de prata (AgNO_3) gasto até ao ponto de equivalência, expresso em centímetro cúbico, que se pode gastar num ensaio.

Na Tabela 28 é apresentado o valor do limite de quantificação (1.6.2.1.2) e deteção (1.6.2.1.1) para a determinação do teor de cloretos.

Tabela 28. Valor do limite de quantificação e deteção obtido para a determinação do teor de cloretos

	Limite de Quantificação (LQ) (mg/l)	Limite de Deteção (LD) (mg/l)
<i>Cloretos</i>	4	1,33

3.3.2 Precisão

A precisão deste trabalho foi estimada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

3.3.2.1 Repetibilidade

Na Tabela 29 são representados os resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade (1.6.4.1). 7

Tabela 29. Estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de cloretos

<i>Amostra</i>	Estudo da repetibilidade												
	Ensaio 1 (ml)	Ensaio 2 (ml)	Ensaio 3 (ml)	Ensaio 4 (ml)	Ensaio 5 (ml)	Ensaio 6 (ml)	Ensaio 7 (ml)	Ensaio 8 (ml)	Média (ml)	Variância (s²)	Desvio padrão (s)	Desvio padrão relativo (%)	Limite da repetibilidade (ml/l)
<i>Branco</i>	1,24	1,24	1,22	1,26	1,22	1,22	1,24	1,26	1,24	0,0003	0,0167	1,3487	0,0467
<i>Tinto</i>	1,30	1,26	1,28	1,28	1,28	1,30	1,26	1,28	1,28	0,0002	0,0151	1,1811	0,0423
<i>Rosé</i>	4,08	4,02	4,04	4,02	4,04	4,02	4,02	4,02	4,03	0,0005	0,0212	0,5261	0,0594
<i>Porto</i>	0,88	0,86	0,86	0,86	0,88	0,88	0,92	0,86	0,87	0,0004	0,0207	2,3659	0,0580
<i>Espumante</i>	1,98	1,96	2,00	1,98	1,98	1,98	1,94	1,94	1,97	0,0005	0,0214	1,0853	0,0599

(ver anexo 2)

3.3.2.1.1 Teste de Grubbs

Na seguinte tabela encontram-se os resultados obtidos para o teste de Grubbs (1.6.4.1.1) das diferentes amostras de vinho.

Tabela 30. Resultados obtidos para o teste de grubbs na determinação do teor de cloretos

TESTE DE GRUBBS							
Amostra	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
<i>Branco</i>	2,274	1,22	1,049	Aceitável	1,26	1,348	Aceitável
<i>Tinto</i>	2,274	1,26	1,323	Aceitável	1,30	1,323	Aceitável
<i>Rosé</i>	2,274	4,02	0,589	Aceitável	4,08	2,239	Aceitável
<i>Porto</i>	2,274	0,86	0,725	Aceitável	0,92	2,174	Aceitável
<i>Espumante</i>	2,274	1,94	1,403	Aceitável	2,00	1,403	Aceitável

A análise aos valores mínimos e máximos de cada amostra indica a inexistência de resultados discrepantes, uma vez que o valor obtido de G experimental é inferior ao valor crítico para um nível de significância de 1% (ver anexo 1 e 2).

3.2.2.1.2 Teste C de Cochran

Na Tabela 31 estão representados os resultados obtidos para o teste C de Cochran (1.6.4.1.2) na determinação do teor de cloretos.

Tabela 31. Resultados obtidos para o teste C de Cochran na determinação do teor de cloretos

Teste C de Cochran	
<i>Numero de matrizes</i>	5
<i>Maior Variância</i>	0,001
<i>C de Cochran (calculado)</i>	0,271
<i>Valor crítico tabelado - C_c (5 %)</i>	0,4241
<i>Avaliação</i>	CCalc < Ctab5%
<i>Valor do limite da repetibilidade (média dos resultados da coluna "Limite da repetibilidade")</i>	0,05325886
<i>Conclusão</i>	Valor aceite

O valor critico para k = 5 (para 5% de significância) é igual a 0,4241(tabelado). O valor calculado (0,271) é menor que o valor tabelado, assim conclui-se que o valor calculado é menos variável, isto é, mais preciso (ver anexo 1 e 2).

3.3.2.2 Precisão Intermédia

Nas tabelas seguintes encontram-se registados os resultados obtidos para a avaliação da precisão intermédia (**1.6.4.2**) da determinação de cloretos em amostras de vinho (Branco, Tinto, Rosé, Porto, Sangria e Espumante).

Tabela 32. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho Branco

<i>Data</i>	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,18	1,2
12/04/2017	1,18	1,2
18/04/2017	1,3	1,32
19/04/2017	1,22	1,24
20/04/2017	1,24	1,22
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,01	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	3,2	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,01	

A concentração média de cloretos na amostra de vinho Branco apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,01 um limite da precisão intermédia de 3,2 % e uma incerteza de medição de 0,01 ml.

Tabela 33. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho Tinto

<i>Data</i>	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,22	1,22
12/04/2017	1,26	1,24
18/04/2017	1,36	1,36
19/04/2017	1,26	1,24
20/04/2017	1,3	1,3
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,01	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	2,0	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,01	

A concentração média de cloretos na amostra de vinho Tinto apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,01 um limite da precisão intermédia de 2,0 % e uma incerteza de medição de 0,01 ml.

Tabela 34. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho Rosé

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	4,02	4
12/04/2017	4,06	4,02
18/04/2017	4,12	4,12
19/04/2017	4	4,02
20/04/2017	4,02	4,04
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,02	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	1,2	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,004	

A concentração média de cloretos na amostra de vinho Rosé apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,02 um limite da precisão intermédia de 1,2 % e uma incerteza de medição de 0,004 ml.

Tabela 35. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de vinho do Porto

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	0,88	0,88
12/04/2017	0,88	0,88
18/04/2017	0,98	1,02
19/04/2017	0,88	0,86
20/04/2017	0,92	0,94
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,02	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	4,8	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,02	

A concentração média de cloretos na amostra de vinho do Porto apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,02 um limite da precisão intermédia de 4,8 % e uma incerteza de medição de 0,02 ml.

Tabela 36. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de Sangria

Data	Ensaio A	Ensaio B
10/04/2017	0,96	0,94
12/04/2017	0,88	0,88
18/04/2017	0,94	0,96
19/04/2017	0,84	0,84
20/04/2017	0,9	0,92
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,01	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	3,4	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,01	

A concentração média de cloretos na amostra de Sangria apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,01 um limite da precisão intermédia de 3,4 % e uma incerteza de medição de 0,01 ml.

Tabela 37. Resultados obtidos para a precisão intermédia da determinação do teor de cloretos numa amostra de Espumante

Data	Ensaio A	Ensaio B
11/04/2017	1,54	1,5
12/04/2017	2	2
18/04/2017	2,08	2,08
19/04/2017	1,98	1,94
20/04/2017	2,02	2
<i>Desvio padrão da precisão intermédia</i>	0,02	
<i>Limite da precisão intermédia (%)</i>	2,8	
<i>Incerteza da medição (ml)</i>	0,01	

A concentração média de cloretos na amostra de Espumante apresenta um desvio padrão da precisão intermédia de 0,02 um limite da precisão intermédia de 2,8 % e uma incerteza de medição de 0,01 ml.

3.3.3 Exatidão

Os resultados finais da exatidão (1.6.5) para o método de cloretos são apresentados nas Tabelas 38 e 39

Tabela 38. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ < 20 na análise da exatidão para o método de cloretos

Matriz	Data	Valor obtido	Valor alvo	Incerteza padrão	Desvio padrão robusto	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de resultados	z-score
White wine	mar/12	13	10	1	3	16	4	17	1,00
Dry rosé wine	nov/12	18	18	1	2	22	14	15	0,00
Red wine	dez/12	18	17	1	4	25	9	14	0,25
White wine	jan/13	14	14	1	3	20	8	15	0,00
Sparkling wine	mai/13	20	18	1	3	24	12	14	0,67
White wine	jun/13	12	13	2	5	23	3	14	-0,20
White wine	out/13	11	17	4	11	39	0	11	-0,55
Dry rosé wine	nov/13	20	20	1	2	24	16	12	0,00
Sparkling wine	mai/14	18	27	2	7	41	13	13	-1,29
White Wine	jun/14	5	8	1	2	12	4	14	-1,50
White wine	out/14	4	10	1	4	18	2	15	-1,50
Sparkling wine	fev/15	13	13	1	4	21	5	17	0,00
White wine	out/15	16	17	1	5	27	7	19	-0,20
White wine	out/15	15	17	1	5	27	7	19	-0,40
Sparkling wine	fev/16	13	21	2	6	33	9	7	-1,33
Sparkling wine	fev/16	13	21	2	6	33	9	7	-1,33

Tabela 39. Resultados dos ensaios interlaboratoriais com LQ > 20 na análise da exatidão para o método de cloretos

Matriz	Data	Valor obtido	Valor alvo	Incerteza padrão	Desvio padrão robusto	Valor máximo	Valor mínimo	Nº de resultados	z-score
Red wine	fev/12	26	25	1	2	29	21	15	0,50
White wine	out/12	39	40	1	4	48	32	17	-0,25
Sparkling wine	nov/12	28	28	2	6	40	16	16	0,00
Red wine	fev/13	37	35	2	6	47	23	17	0,33
Sparkling wine	fev/13	42	32	2	7	46	18	17	1,43
Red wine	abr/15	31	29	2	6	41	17	19	0,33

A avaliação da exatidão do método com base na participação em EIL, permite concluir que se trata de métodos exatos, uma vez que os valores de z-score obtidos são todos inferiores a 2 (ver anexo 3).

4. Conclusão

Este trabalho decorrido na íntegra na empresa Silliker Portugal S.A. teve por objetivo a realização e validação dos métodos de quantificação de anidrido sulfuroso livre e total nos vinhos por iodometria e os cloretos nos vinhos por potenciometria. Os resultados da determinação dos métodos anteriormente descritos, permitem verificar que foi possível validar os diferentes tipos de métodos nos diferentes vinhos, cumprindo os objetivos do trabalho.

A validação consistiu num processo dinâmico que integra as fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos equipamentos, materiais e da mão-de-obra numa fase inicial e que continuou no decorrer da fase experimental. Foram realizados vários estudos para validar a metodologia tais como linearidade, limites de deteção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão. Selecionou-se alguns vinhos para a gama de trabalho que neste caso foram o vinho Branco, Tinto, Rosé, Porto, Sangria e Espumante.

Os resultados da validação, por exemplo para a determinação do anidrido sulfuroso livre, mostram que o método analítico apresenta um limite de quantificação e de deteção de 5,12 mg/l e 1,71 mg/L, respetivamente.

O estudo da repetibilidade foi efetuado sobre seis amostras diferentes analisadas no mesmo dia, tendo-se determinado o limite de repetibilidade. Por exemplo, no caso da amostra de vinho do Porto para o método do anidrido sulfuroso livre, o limite de repetibilidade foi de 0,1296 o que indica que a diferença entre os oito ensaios não deve ultrapassar este valor de limite de repetibilidade.

A avaliação da precisão intermédia foi feita sobre seis amostras diferentes em dias de ensaio diferentes. Determinou-se o limite de precisão intermédia e o respetivo desvio padrão. A determinação de anidrido sulfuroso livre, por exemplo em amostras de vinho tinto apresenta um limite da precisão intermédia de 7,8 % e um desvio padrão de 0,03. Com aplicação do teste de Grubbs foi possível em todos os métodos verificar a ausência de resultados anómalos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia.

No critério da precisão intermédia verificou-se uns valores mais elevados e irregulares do limite de precisão intermédia devido à apresentação dos resultados se apresentarem com duas casas decimais e dos resultados obtidos serem muito pequenos.

Para a avaliação da exatidão dos métodos, recorreu-se aos ensaios interlaboratoriais tendo-se verificado que a exatidão satisfaz o critério estabelecido pelo IPAC, a participação em, pelo menos, um ensaio interlaboratorial, promovido por uma entidade reconhecida, com desempenho satisfatório, ou seja, com z-score <2.

Os resultados dos processos de validação dos métodos analíticos abordados neste trabalho foram, em geral, satisfatórios para todos os parâmetros avaliados.

Com este trabalho, pode concluir-se que o processo de validação é indispensável para garantir a qualidade e credibilidade dos resultados obtidos por um método validado.

Após a validação dos métodos propostos neste trabalho, algumas propostas que podem ser realizadas futuramente são as seguintes:

- ✓ Participar em ensaios interlaboratoriais, testes comparativos ou utilizar materiais de referência certificados para avaliar a exatidão;
- ✓ Avaliar a estabilidade das soluções amostra e padrão, ao longo do tempo, enquanto se encontram na bancada de trabalho.

A nível pessoal, este estágio permitiu a aprendizagem de novos conhecimentos nas diversas áreas e o desenrolar de novas competências laboratoriais, possibilitando um crescimento e aprendizagem com os desafios colocados diariamente. Foi, por isso, uma experiência enriquecedora quer a nível pessoal quer profissional.

5. Referencias bibliográficas

Akiyama, H., J. Sakushima, S. Taniuchi, T. Kanda, A. Yanagida, T. Kojima, R. Teshima, *et al.* "Antiallergic Effect of Apple Polyphenols on the Allergic Model Mouse." *Biol Pharm Bull* 23, no. 11 (2000): 1370-3.

ALAP - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Guia Relacre 13 Validação De Métodos Internos De Ensaio Em Análise Química. RELACRE ed. Lisboa (2000).

AMERINE, A; JOSLYN, M. A. "Composition of Grapes and Distribution of Phenolics from Table Wines, the Technology of Their Production." (1987): 234-38.

Arts, I. C., and P. C. Hollman. "Polyphenols and Disease Risk in Epidemiologic Studies." [In eng]. *Am J Clin Nutr* 81, no. 1 Suppl (2005): 317s-25s.

AZEVEDO, J; FERNANDES, I; FARIA, A; OLIVEIRA, J; FERNANDES, A; DE FREITAS, V; MATEUS, N. "Antioxidant Properties of Anthocyanidins, Anthocyanidin-3- Glucosides and Respective Portisins." *Food Chemistry* (2010): 518-23.

BALL, GFM "Fat-Soluble Vitamins." In *In Nollet, L.M.L. Food Analysis by Hplc, Second Edition*, 321-402: Taylor & Francis (2000).

BALSA, Casimiro. "O Consumo De Bebidas Alcoólicas Em Portugal. Prevalências E Padrões De Consumo 2001-2007." 215. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa (2011).

Baranowski, J. D., and C. W. Nagel. "Isolation and Identification of the Hydroxycinnamic Acid-Derivatives in White Riesling Wine." *American Journal of Enology and Viticulture* 32, no. 1 (1981): 5-13.

Barrère, C., Ducasse, M. e Inquimbert, M. Vignes et Vins, 295:49 (1980).

Beech, F., Burroughs, L., Timberlake, C. e Whiting, G. Bull. OIV, 52 (586):1001 (1979).

Beckman, Carl H. "Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation in Wilt Disease Resistance and in General Defence Responses in Plants?". *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57, no. 3 (2000): 101-10.

Bravo, L. "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance." *Nutr Rev* 56, no. 11 (1998): 317-33.

Bruneton, Jean. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. Paris; Cachan: Éditions Tec & Doc ; Éditions médicales internationales (1999).

Buechsenstein, J.; Ough, C. SO₂ Determination by aeration-oxidation: A comparison with ripper. *Am. J. Enol. Vitic.* (1978): 29, 161–164.

CARDOSO, A. O vinho – da uva à garrafa, Âncora, Lisboa (2007).

Claessens, Henk Anton. "Characterization of Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography : Column Testing, Classification and Chemical Stability." Technische Universiteit Eindhoven (1999).

Clark, Jim. "High Performance Liquid Chromatography – Hplc." <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>.(2009).

Coli, M. S., Rangel, A. G., Souza, E. S., Oliveira, M. F., & Chiaradia, A. C. (2015). Conteúdo de cloretos em vinhos brancos de diferentes. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 36(4):503-507.

Common wealth of Australia. Standard P4. Wine, sparkling wine and fortified wine. Australian Food Standards Code. (Australian Government Publishing Service: Canberra; (1997). Reproduced by Food Liaison Pty. Ltd. Canberra).

Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis; O.I.V.: Paris, France; Volume 2 (2006).

Cordonnier, R. Les mrtaux du vin. *Bull. Techn. Inf.*, 196, (1965): 107-112.

Corradini, D; PHILLIPS, TM. . *Handbook of Hplc* [in English]. Boca Raton: Taylor & Francis (2010).

CURVELO-GARCIA A. Controlo de qualidade dos vinhos. Química Enológica. Métodos Analíticos, Instituto da Vinha e dos Vinhos, Portugal (1988).

Curvelo-Garcia, A.S. e San Romão, M.V. *Enologia*, 1:25 (1985 a).

Curvelo-Garcia, A.S. e San Romão, M.V. *Enologia, Ciência Tec. Vitiv.*, 4(1):5 (1985 b).

DELANOE D., MAILLARD C., MAISONDIEU D. *O vinho da Análise à Elaboração*. Publicações Europa-América, Lisboa (1997).

Edwin, Haslam. "In Vino Veritas: Oligomeric Procyanidins and the Ageing of Red Wines." *Phytochemistry* 19, no. 12 (1980): 2577-82.

Escarpa, A., and M. C. Gonzalez. "An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods." [In En]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31, no. 2 (2001): 57-139.

Escolas, P. d. Obtido em 15 de Abril de 2017, de Titulação Potenciométrica: http://www1.esb.ucp.pt/twt5/motor/display_texto.asp?pagina=titulacaopotenciometrica200403091952109&bd=cec (2017).

Europeia, U.. REGULAMENTO (CE) N.º 606/2009 . *Jornal Oficial da União Europeia* (2009).

Faria, A., C. Calhau, V. de Freitas, and N. Mateus. "Procyanidins as Antioxidants and Tumor Cell Growth Modulators." *Journal of agricultural and food chemistry* 54, no. 6 (2006): 2392-7.

Frankel, E.N. (University of California, Davis, CA.), A.L. Waterhouse, and P.L. Teissedre. "Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins." *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995): 890-4.

Fulcrand, H., V. Atanasova, E. Salas, and V. Cheynier. "The Fate of Anthocyanins in Wine: Are There Determining Factors?" *ACS SYMPOSIUM SERIES*, no. 886 (2004): 68-88.

C, Galacho. "A Química "Doce" Do Vinho." Universidade de Évora. Disponível em: http://home.uevora.pt/~ueline/quimica_para_todos/a_quimica_doce_do_vinho.pdf [consultado em 14/01/2017].

Graf, Brigitte A., Paul E. Milbury, and Jeffrey B. Blumberg. "Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence." *Journal of Medicinal Food* 8, no. 3 (2005): 281-90.

Heim, Kelly E., Anthony R. Tagliaferro, and Dennis J. Bobilya. "Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships." *JNB</cja:jid> The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, no. 10 (2002): 572-84.

Heintze, K., Braun, F. e Fricker, A. Die Industr. Obst – u. Gemüseverwertung, 59:452 (1974).

Herrmann, K. "Flavonols and Flavones in Food Plants: A Review." *IJFS International Journal of Food Science & Technology* 11, no. 5 (1976): 433-48.

Hrazdina, G., A. J. Borzell, and W. B. Robinson. "Studies on the Stability of the Anthocyanidin-3,5-Digucosides." *American Journal of Enology and Viticulture* 21, no. 4 (1970): 201-04.

Ignat, I., I. Volf, and V. I. Popa. "A Critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables." *Food chemistry* 126, no. 4 (2011): 1821-35.

Iland, P.; Bruer, N.; Edwards, G.; Weeks, S.; Wilkes, E. Analysis Method In *Chemical Analysis of Grapes and Wine: Techniques and Concepts*; Patrick Iland Wine Promotions: Campbelltown, Australia. (2004): p. 57.

INSTITUTO DO VINHO E DA VINHA, I., P. Disponível em: <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/1736.html> [consultado em 22/12/2016] (2009).

INSTITUTO DO VINHO E DA VINHA, I., P. Disponível em: <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/89/> [consultado em 22/05/2017] (2017).

ISO Standards Handbook, Statistical Methods for Quality Control Vol. 2, Measurement Methods and Results, Interpretation of Statistical Data Process Control, 4th Edition, (1995).

Jackson, R.s., Wine Science Principles, Practice, Perception, Academic Press, San Diego- USA, 2nd ed. (2000).

Jackson, Ron S. "Chemical Constituents of Grapes." In *Wine Science : Principles and Applications*, 178-219. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press (2008).

Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, *et al.* "Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes." [In English]. *Science (New York, N.Y.)* 275, no. 5297 (1997): 218-20.

Kelly, W., D., Basis Statistics for Laboratories, Van Nostrand Reynolds, (1991).

Kanner, Joseph, Edwin Frankel, Rina Granit, Bruce German, and John E. Kinsella. "Natural Antioxidants in Grapes and Wines." [In English]. *J. Agric. Food Chem. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, no. 1 (1994): 64-69.

Kennedy, James A. "Grape and Wine Phenolics : Observations and Recent Findings." [In English]. *Ciencia e investigación agraria [artículo de revista]* 35, no. 2 (2008): 107-20.

Khafif, A., S. P. Schantz, T. C. Chou, D. Edelstein, and P. G. Sacks. "Quantitation of Chemopreventive Synergism between (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Curcumin in Normal, Premalignant and Malignant Human Oral Epithelial Cells." [In eng]. *Carcinogenesis* 19, no. 3 (1998): 419-24.

Latorre, N. Del Iodomatic Quéré T80 al Valorador ENO 20: la aparición de un nuevo concepto: SO₂ activo. *Revista enólogos* (2017): p54.

Leske, P., Sas, A., Coulter, A., Stockley, C., & Lee, T. The composition of Australian grape juice: chloride, sodium and sulfate ions. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (1997).

Lima, J. L. F. C., & Rangel, A. O. S. S. Chloride pseudotitration in wines by FIA with a Ag₂S/Ag tubular electrode as detector. *Journal of Food Composition and Analysis* (1989).

Macheix, J. J., J. C. Sapis, and A. Fleuriet. "Phenolic Compounds and Polyphenoloxidase in Relation to Browning in Grapes and Wines." [In English]. *Critical reviews in food science and nutrition* 30, no. 4 (1991): 441-86.

Mamede, Maria E. O., Helena M. A. B. Cardello, and Gláucia M. Pastore. "Evaluation of an Aroma Similar to That of Sparkling Wine: Sensory and Gas Chromatography Analyses of Fermented Grape Musts." [In English]. *Food Chemistry* 89, no. 1 (2005): 63-68.

MAMEDE, MARIA EUGÊNIA DE OLIVEIRA, and GLÁUCIA MARIA PASTORE. "Compostos Fenólicos Do Vinho: Estrutura E Ação Antioxidante." (2005): 233-52.

Maltman A. Minerality in wine: a geological perspective. *J Wine Res.* 2013;24(3): 169-81.

Março, Paulo Henrique, Ronei Jesus Poppi, and Ieda Spacino Scarminio. "Procedimentos Analíticos Para Identificação De Antocianinas Presentes Em Extratos Naturais." *Química Nova* 31, no. 5 (2008): 1218-23.

Mello, Maria Lucília Mercês de ;, José ; Barrias, and João Breda. *Álcool E Problemas Ligados Ao Álcool Em Portugal.* Lisboa Direcção-Geral da saúde (2001).

Mendham, J., and J.C. Afonso. *Vogel: Análise Química Quantitativa.* Livros Tecnicos e Científicos (2002).

Merieux Nutrisciences. Disponível em: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por> [consultado em 20/12/2016]

Minarik, E. *Feuillets verts de l'OIV*, 750 (1982).

Monagas, Maria, Begoña Bartolomé, and Carmen Gómez-Cordovés. "Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine." [In English]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, no. 2 (2005): 85-118.

Moraes, Vanderléia, and Claudriana Locatelli. "Vinho: Uma Revisão Sobre a Composição Química E Benefícios À Saúde." 2012 10, no. 1-2 (2012): 12.

Morley, N., T. Clifford, L. Salter, S. Campbell, D. Gould, and A. Curnow. "The Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate and Green Tea Can Protect Human Cellular DNA from Ultraviolet and Visible Radiation-Induced Damage." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21, no. 1 (2005): 15-22.

MTB. Obtido em 15 de Abril de 2017, de MTB Precision technology: <http://www.mtbrandao.com/editorial/media/titulacao-potenciometrica/> (2011).

Nacz, Marian, and Fereidoon Shahidi. "Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, no. 5 (2006): 1523-42.

Nollet, L.M.L., and F. Toldra. *Food Analysis by Hplc*, Third Edition. Taylor & Francis (2013).

Oliver DP, Bramley RGV, Riches D, Porter I, Edwards J. Review: soil physical and chemical properties as indicators of soil quality in Australian viticulture. *Aust J Grape Wine R* (2013) 19:129-39.

Penna, Neidi Garcia, Carlos Eugenio Daudt, and João Antônio Pêgas Henriques. "Comportamento De Ésteres Hidroxicinâmicos Durante a Vinificação De Vinhos Brancos." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36 (2001): 983-89.

PEYNAUD E. *Conhecer e trabalhar o vinho*, Litexa, Lisboa (1993).

Peynaud, E. *Knowing and Making Wine*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, (1984) pp. 135–136, 267–269.

Pontallier, P., Callède, I. e Ribéreau-Gayon, P. *Sci. Aliments*, (1982) 2 (3):329.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. e Sudraud, P. *Traité d'Oenologie – Sciences et Techniques du Vin. Tome 4 (Clarification et Stabilisation. Matériels et Installations)*. Dunod, Paris (1977).

RIBÉREAU-GAYON, P; GLORIES, Y; MAUJEAN, A. & DUBOURDIEU, D. *Chimie Du Vin - Stabilisation Et Traitements*. Paris: Dunod (1998).

Rice-evans, Catherine A., Nicholas J. Miller, Paul G. Bolwell, Peter M. Bramley, and John B. Pridham. "The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids." [In English]. *Free Radical Research* 22, no. 4 (1995): 375-83.

Rice-Evans, Catherine A., Nicholas J. Miller, and George Paganga. "Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids." *Free Radical Biology and Medicine* 20, no. 7 (1996): 933-56.

Rice-Evans, Catherine, Nicholas Miller, and George Paganga. "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds." [In English]. *TRPLSC Trends in Plant Science* 2, no. 4 (1997): 152-59.

Ripper, M. Schweflige säure in weinen und deren bestimmung. *J. Prakt. Chem.* (1892), 46, 428–473.

Rizzon LA. Teor de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. In: *Vinho e Saúde: vinho como alimento natural*. Bento Gonçalves. Simpósio Internacional Vinho e Saúde. Bento Gonçalves: Ibravin (2005). p. 41-42.

Rizzon LA, Miele A. Discrimination of brazilian red varietal wines according to theirs sensory descriptors. 2011. *Ciën Agrotec. Lavras* (2011); 35(6):1172-7.

Robards, Kevin, and Michael Antolovich. "Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoidsa Review." *The Analyst* 122, no. 2 (1997): 11R-34R.

Rodríguez-Delgado, Miguel-Ángel, Guillermo González-Hernández, José-Elias Conde-González, and Juan-Pedro Pérez-Trujillo. "Principal Component Analysis of the Polyphenol Content in Young Red Wines.". *Food Chemistry* 78, no. 4 (2002): 523-32.

Salty skin: red mostatrisk. R & D At Work . Disponível em: http://www.gwrdc.com.au/wp-content/uploads/2012/04/RD_Work_GW_OCT_11.pdf (2011): p. 2.

Santos-Buelga, Celestino, Gary Williamson, and Chemistry Royal Society of. *Methods in Polyphenol Analysis* [in English]. Cambridge: Royal Society of Chemistry (2003).

Scalbert, A., and G. Williamson. "Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols." [In English]. *The Journal of nutrition* 130, no. 8S (2000): 2073S-85S.

Shim, J. S., M. H. Kang, Y. H. Kim, J. K. Roh, C. Roberts, and I. P. Lee. "Chemopreventive Effect of Green Tea (*Camellia Sinensis*) among Cigarette Smokers." [In English]. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 4, no. 4 (1995): 387-91.

Silliker. *Manual Da Qualidade*. 12 ed.: Silliker, S.A (2016).

Singh, A., S. Holvoet, and A. Mercenier. "Dietary Polyphenols in the Prevention and Treatment of Allergic Diseases." [In English]. *Clinical & Experimental Allergy* 41, no. 10 (2011): 1346-59.

Schopfer, J.F e Aerny, J. *Bull. OIV*, 58 (652-653):514 (1985).

Spence, C., and B. Piqueras-Fiszman. *The Perfect Meal: The Multisensory Science of Food and Dining*. Wiley (2014).

Stockley, C. Sulfur dioxide and the wine consumer. *Aust. N. Z. Grapegrow. Winemaker* (2005): 501, 73–76.

Sylwester, Czaplicki. *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*. INTECH Open Access Publisher (2013).

Teissedre, P. L., E. N. Frankel, A. L. Waterhouse, H. Peleg, and J. B. German. "Inhibition of in Vitro Human Ldl Oxidation by Phenolic Antioxidants from Grapes and Wines." *Journal of the science of food and agriculture* 122 (1996): 157-68.

Tregeagle JM, Tisdall JM, Blackmore DH, Walker RR. A diminished capacity for chloride exclusion by grapevine rootstocks following long-term saline irrigation in an inland versus a coastal region of Australia. *Aust J Grape Wine R.* (2006); 12:178-91.

UNODCCP - United Nations Office for Drug, Control, and Prevention Crime. World Drug Report 2000. Oxford; New York: Oxford University Press (2000).

Usseglio-Tomasset, L., Ciolfi, G e Pagliara, A. Vini d'Italia, XXVI (1981).

V., Kovac, Bourzeix M., Heredia N., and Ramos T. "A Study of Catechins and Proanthocyanidins of White Grapes and Wines [Physiological Activities]." 125 (1990): 7-15.

Valls, J., S. Millan, M. P. Marti, E. Borrás, and L. Arola. "Advanced Separation Methods of Food Anthocyanins, Isoflavones and Flavanols." [In eng]. J Chromatogr A 1216, no. 43 (2009): 7143-72.

Vandenberg, Brian. "OCDE, 2015. Tackling Harmful Alcohol Use: Economics and Public Health Policy Franco Sassi (Ed) Paris, France: Pb." Drug and Alcohol Review 35, no. 3 (2016): 367-68.

Vidal, Stéphane, Leigh Francis, Sylvain Guyot, Nathalie Marnet, Mariola Kwiatkowski, Richard Gawel, Véronique Cheynier, and Elizabeth J. Waters. "The Mouth-Feel Properties of Grape and Apple Proanthocyanidins in a Wine-Like Medium." JSFA Journal of the Science of Food and Agriculture 83, no. 6 (2003): 564-73.

VOGEL, Arthur Israel. Análise química quantitativa. 6 ed. LTC (2008).

Walker RR, Blackmore DH Clingeleffer PR, Godden P, Francis L, Valente P, Robinson E. Salinity effects on vines and wines. Bulletin de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2003): 76:865–6.

Walker RR, Blackmore DH, Gong H. Organic and inorganic anions in shiraz and chardonnay grape berries and wine as affected by rootstock under saline conditions. 2010. Aust J Grape Wine R. (2010); 16:227–36.

Wenzel, K., H. H. Dittrich, and M. Heimfarth. "Die Zusammensetzung Der Anthocyane in Den Beeren Verschiedener Rebsorten." no. 2 (1987): 65-78.

Winkel-Shirley, B. "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology." Plant physiology 126, no. 2 (2001): 485-93.

Wolfe, K. L., X. Kang, X. He, M. Dong, Q. Zhang, and R. H. Liu. "Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits." *Journal of agricultural and food chemistry* 56, no. 18 (2008): 8418-26.

Wucherpfenning, K. Rapport interne CEE. Die Schweflige Säure im Wein. Oenologische und Toxicologische Aspekte (1983).

6. Anexos

Anexo 1

Tabela 40. Valores críticos para teste de Grubbs

p	um maior ou um menor
valor critico 1%	
3	1,155
4	1,496
5	1,764
6	1,973
7	2,139
8	2,274
9	2,387
10	2,482
11	2,564
12	2,636
13	2,699
14	2,755
15	2,806
16	2,852

p	um maior ou um menor
valor critico 1%	
17	2,894
18	2,932
19	2,968
20	3,001
21	3,031
22	3,060
23	3,087
24	3,112
25	3,135
26	3,157
27	3,178
28	3,199
29	3,218
30	3,236

p	um maior ou um menor
valor critico 1%	
31	3,253
32	3,270
33	3,286
34	3,301
35	3,316
36	3,330
37	3,343
38	3,356
39	3,369
40	3,381

p = número de laboratórios num dado nível

Tabela 41. Valores críticos para teste C de Cochran

v_x (Número de ensaios) k Graus de liberdade $=n-1 = 10-1 = 9$	
	valor critico 5%
2	0,8010
3	0,6167
4	0,5017
5	0,4241
6	0,3682
7	0,3259
8	0,2926
9	0,2659
10	0,2439
11	0,2439
12	0,2098
15	0,1736
20	0,1357
24	0,1160
30	0,0958
<i>k= número de matrizes</i>	

Anexo 2

Tabela 42. Resultado do estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso livre

Amostra

Estudo da repetibilidade

	Ensaio 1 (ml)	Ensaio 2 (ml)	Ensaio 3 (ml)	Ensaio 4 (ml)	Ensaio 5 (ml)	Ensaio 6 (ml)	Ensaio 7 (ml)	Ensaio 8 (ml)	Média (ml)	Variância (s ²)	Desvio padrão (s)	Desvio padrão relativo (%)	Limite da repetibilidade (ml/l)
Branco	1,9	1,9	1,9	1,8	1,75	1,95	1,9	1,8	1,8625	0,0048	0,0694	3,7281	0,1944
Tinto	1,50	1,40	1,40	1,55	1,65	1,55	1,40	1,40	1,4813	0,0092	0,0961	6,4898	0,2692
Rosé	1,25	1,25	1,35	1,3	1,3	1,2	1,2	1,25	1,2625	0,0027	0,0518	4,0994	0,1449
Porto	0,4	0,35	0,4	0,4	0,45	0,35	0,3	0,35	0,3750	0,0021	0,0463	12,3443	0,1296
Sangria	0,25	0,25	0,2	0,15	0,2	0,2	0,15	0,2	0,2000	0,0014	0,0378	18,8982	0,1058
Espumante	0,4	0,4	0,35	0,35	0,3	0,45	0,4	0,35	0,3750	0,0021	0,0463	12,3443	0,1296

Tabela 43. Resultados obtidos para o estudo do teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso livre

TESTE DE GRUBBS

Amostra	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Branco	2,274	1,75	1,620	Aceitável	1,95	1,260	Aceitável
Tinto	2,274	1,40	0,845	Aceitável	1,65	1,755	Aceitável
Rosé	2,274	1,20	1,208	Aceitável	1,35	1,691	Aceitável
Porto	2,274	0,30	1,620	Aceitável	0,45	1,620	Aceitável
Sangria	2,274	0,15	1,323	Aceitável	0,25	1,323	Aceitável
Espumante	2,274	0,30	1,620	Aceitável	0,45	1,620	Aceitável

Tabela 44. Resultado do estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de anidrido sulfuroso total

Estudo da repetibilidade

Amostra	Ensaio 1 (ml)	Ensaio 2 (ml)	Ensaio 3 (ml)	Ensaio 4 (ml)	Ensaio 5 (ml)	Ensaio 6 (ml)	Ensaio 7 (ml)	Ensaio 8 (ml)	Média (ml)	Variância (s ²)	Desvio padrão (s)	Desvio padrão relativo (%)	Limite da repetibilidade e (ml/l)
Branco	1,75	1,8	1,9	1,65	1,8	1,75	1,75	1,8	1,7750	0,0050	0,0707	3,9837	0,1980
Tinto	1,4	1,55	1,55	1,45	1,5	1,5	1,45	1,55	1,4938	0,0032	0,0563	3,7690	0,1576
Rosé	1,8	1,85	1,85	1,8	1,75	1,85	1,75	1,85	1,8125	0,0020	0,0443	2,4453	0,1241
Porto	0,8	0,85	0,9	0,85	0,9	0,95	0,7	0,8	0,8438	0,0060	0,0776	9,2009	0,2174
Sangria	0,55	0,5	0,5	0,45	0,45	0,55	0,5	0,55	0,5063	0,0017	0,0417	8,2422	0,1168

Espuma nte	2	1,95	2	2,6	2	2,6	2,8	2,2	2,2688	0,1178	0,3432	15,1290	0,9611
---------------	---	------	---	-----	---	-----	-----	-----	--------	--------	--------	---------	--------

Tabela 44. Resultados obtidos para o estudo do teste de Grubbs na determinação do teor de anidrido sulfuroso total

TESTE DE GRUBBS

Amostra	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Branco	2,274	1,65	1,768	Aceitável	1,90	1,768	Aceitável
Tinto	2,274	1,40	1,665	Aceitável	1,55	0,999	Aceitável
Rosé	2,274	1,75	1,410	Aceitável	1,85	0,846	Aceitável
Porto	2,274	0,70	1,852	Aceitável	0,95	1,369	Aceitável
Sangria	2,274	0,45	1,348	Aceitável	0,55	1,049	Aceitável
<i>Espumante</i>	2,274	1,95	0,929	Aceitável	2,80	1,548	Aceitável

Tabela 45. Resultado do estudo da repetibilidade para os diferentes tipos de vinhos na determinação dos teores de cloretos

Estudo da repetibilidade

Amostra	Ensaio 1 (ml)	Ensaio 2 (ml)	Ensaio 3 (ml)	Ensaio 4 (ml)	Ensaio 5 (ml)	Ensaio 6 (ml)	Ensaio 7 (ml)	Ensaio 8 (ml)	Média (ml)	Variância (s ²)	Desvio padrão (s)	Desvio padrão relativo (%)	Limite da repetibilidade (ml/l)
Branco	1,24	1,24	1,22	1,26	1,22	1,22	1,24	1,26	1,2375	0,0003	0,0167	1,3487	0,0467
Tinto	1,3	1,26	1,28	1,28	1,28	1,3	1,26	1,28	1,2800	0,0002	0,0151	1,1811	0,0423
Rosé	4,08	4,02	4,04	4,02	4,04	4,02	4,02	4,02	4,0325	0,0005	0,0212	0,5261	0,0594
Porto	0,88	0,86	0,86	0,86	0,88	0,88	0,92	0,86	0,8750	0,0004	0,0207	2,3659	0,0580
Sangria	0,86	0,82	0,88	0,94	0,92	0,84	0,98	0,96	0,9000	0,0034	0,0586	6,5060	0,1640
Espumante	1,98	1,96	2	1,98	1,98	1,98	1,94	1,94	1,9700	0,0005	0,0214	1,0853	0,0599

Tabela 46. Resultados obtidos para o estudo do teste de grubbs na determinação do teor de cloretos

TESTE DE GRUBBS

Amostra	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Branco	2,274	1,22	1,049	Aceitável	1,26	1,348	Aceitável
Tinto	2,274	1,26	1,323	Aceitável	1,30	1,323	Aceitável
Rosé	2,274	4,02	0,589	Aceitável	4,08	2,239	Aceitável
Porto	2,274	0,86	0,725	Aceitável	0,92	2,174	Aceitável
Sangria	2,274	0,82	1,366	Aceitável	0,98	1,366	Aceitável
Espumante	2,274	1,94	1,403	Aceitável	2,00	1,403	Aceitável

Anexo 3

Tabela 47. Resultados do estudo da exatidão na determinação de anidrido sulfuroso livre

N	Produto	Data	L_v	A_v	$bias_{relative}$	$RMS_{bias_{relative}}$	S	$S_{R_{relative}}$	$\bar{S}_{R_{relative}}$	P	\bar{P}	$u(C_{Ref})_{relative}$	$u(bias)_{relative}$	$u(Rw_{relative,c})$	$u_{relative}$	k	$U_{relative}$
1	Port wines	2012-01	8,00	7,00	14,286	36,499	4,00	57,143	31,538	9,00	42,643	6,051	36,997	7,316	37,714	2	75,427
2	Sparkling wine	2012-01	44,00	37,00	18,919		8,00	21,622		60,00							
3	White wine	2012-01	24,00	24,00	0,000		3,00	12,500		73,00							
4	Red wine	2012-02	15,00	15,00	0,000		4,00	26,667		63,00							
5	Naturally sweet wine	2012-02	41,00	43,00	-4,651		5,00	11,628		66,00							
6	Red Porto	2012-02	6,00	6,00	0,000		3,00	50,000		10,00							
7	White Porto	2012-03	9,00	6,00	50,000		4,00	66,667		9,00							
8	White wine	2012-03	31,00	34,00	-8,824		5,00	14,706		70,00							
9	Fortified wine	2012-03	5,00	4,00	25,000		2,00	50,000		56,00							
10	White wine	2012-05	31,00	31,00	0,000		5,00	16,129		72,00							
11	Aromatized wine	2012-05	10,00	8,00	25,000		3,00	37,500		62,00							
12	Red Porto	2012-05	6,00	7,00	-14,286		2,00	28,571		10,00							

13	Red Porto	2012-10	15,00	8,00	87,500		4,00	50,000		8,00							
14	White wine	2012-10	32,00	25,00	28,000		4,00	16,000		69,00							
15	Sparkling wine	2012-11	23,00	15,00	53,333		4,00	26,667		54,00							
16	Dry rosé wine	2012-11	22,00	14,00	57,143		3,00	21,429		59,00							
17	White Porto	2012-11	10,00	6,00	66,667		3,00	50,000		8,00							
18	White wine	2013-01	28,00	28,00	0,000		4,00	14,286		78,00							
19	Red Porto	2013-01	8,00	6,00	33,333		2,00	33,333		6,00							
20	Sparkling wine	2013-02	23,00	23,00	0,000		4,00	17,391		59,00							
21	Red Porto	2013-02	8,00	7,00	14,286		3,00	42,857		8,00							
22	Aromatized wine	2013-05	10,00	5,00	100,000		3,00	60,000		48,00							
23	Red Porto	2013-05	10,00	7,00	42,857		3,00	42,857		6,00							
24	White wine	2013-06	26,00	20,00	30,000		3,00	15,000		74,00							
25	Red wine	2013-09	18,00	15,00	20,000		4,00	26,667		56,00							
26	Red Porto	2013-10	10,00	7,00	42,857		2,00	28,571		9,00							
27	Red wine	2014-02	22,00	20,00	10,000		4,00	20,000		81,00							

28	Rosé Port	2014-02	13,00	9,00	44,444		3,00	33,333		10,00							
29	White wine	2014-03	24,00	27,00	-11,111		7,00	25,926		69,00							
30	Red Port	2014-05	9,00	8,00	12,500		3,00	37,500		9,00							
31	White Wine	2014-06	42,00	34,00	23,529		4,00	11,765		75,00							
32	Red wine	2014-09	20,00	20,00	0,000		7,00	35,000		61,00							
33	White wine	2014-10	23,00	16,00	43,750		3,00	18,750		75,00							
34	Red Port	2014-10	13,00	7,00	85,714		3,00	42,857		8,00							
35	White wine	2015-01	20,00	15,00	33,333		4,00	26,667		66,00							
36	Red Port	2015-01	13,00	10,00	30,000		4,00	40,000		9,00							
37	Sparkling wine	2015-02	22,00	16,00	37,500		2,00	12,500		64,00							
38	Rosé Port	2015-02	8,00	8,00	0,000		4,00	50,000		8,00							
39	White Port	2015-03	6,00	7,00	-14,286		4,00	57,143		9,00							
40	Red Port	2015-10	9,00	8,00	12,500		3,00	37,500		6,00							
41	Red wine	2016-04	20,00	21,00	-4,762		5,00	23,810		67,00							
42	White wine	2017-01	24,00	22,00	9,091		3,00	13,636		72,00							

Tabela 48. Resultados do estudo da exatidão na determinação de anidrido sulfuroso total

N	Produto	Data	L_v	A_v	$bias_{relative}$	$RMS_{bias_{relative}}$	S	$S_{R_{relative}}$	$\bar{S}_{R_{relative}}$	P	\bar{P}	$u(C_{Ref})_{relative}$	$u(bias)_{relative}$	$u(Rw_{relative,p})$	$u_{relative}$	k	$U_{relative}$
1	Port wines	2012-01	48,00	55,00	-12,727	15.295	15,00	27,273	14.713	12,00	45.900	2.721	15.535	4.279	16.113	2	32.227
2	Sparkling wine	2012-01	160,00	159,00	0,629		11,00	6,918		60,00							
3	White wine	2012-01	122,00	103,00	18,447		7,00	6,796		67,00							
4	Red wine	2012-02	58,00	63,00	-7,937		10,00	15,873		63,00							
5	Naturally sweet wine	2012-02	154,00	163,00	-5,521		11,00	6,748		64,00							
6	Red Porto	2012-02	42,00	38,00	10,526		10,00	26,316		12,00							
7	White Porto	2012-03	58,00	51,00	13,725		7,00	13,725		11,00							
8	White wine	2012-03	102,00	97,00	5,155		7,00	7,216		67,00							
9	Fortified wine	2012-03	19,00	30,00	-36,667		7,00	23,333		56,00							
10	White wine	2012-05	115,00	110,00	4,545		8,00	7,273		80,00							
11	Aromatized wine	2012-05	77,00	66,00	16,667		7,00	10,606		62,00							
12	Red Porto	2012-05	38,00	39,00	-2,564		9,00	23,077		13,00							
13	Red wine	2012-09	70,00	56,00	25,000		12,00	21,429		52,00							
14	Red Porto	2012-10	83,00	73,00	13,699		9,00	12,329		11,00							

15	Sparkling wine	2012-11	128,00	118,00	8,475		9,00	7,627		55,00							
16	Dry rosé wine	2012-11	83,00	74,00	12,162		8,00	10,811		67,00							
17	White Porto	2012-11	51,00	43,00	18,605		5,00	11,628		10,00							
18	Naturally sweet wine	2013-01	166,00	151,00	9,934		20,00	13,245		72,00							
19	White wine	2013-01	144,00	136,00	5,882		9,00	6,618		77,00							
20	Red Porto	2013-01	48,00	40,00	20,000		12,00	30,000		10,00							
21	Sparkling wine	2013-02	134,00	123,00	8,943		10,00	8,130		61,00							
22	Red Porto	2013-02	19,00	19,00	0,000		8,00	42,105		12,00							
23	Aromatized wine	2013-05	99,00	97,00	2,062		8,00	8,247		55,00							
24	Sparkling wine	2013-05	179,00	182,00	-1,648		16,00	8,791		53,00							
25	Red Porto	2013-05	32,00	33,00	-3,030		10,00	30,303		10,00							
26	White wine	2013-06	115,00	98,00	17,347		7,00	7,143		75,00							
27	Red wine	2013-09	45,00	39,00	15,385		11,00	28,205		55,00							
28	Wine flavoured drink	2013-10	154,00	136,00	13,235		7,00	5,147		51,00							
29	White wine	2013-10	141,00	123,00	14,634		12,00	9,756		60,00							

30	Sparkling wine	2013-11	118,00	103,00	14,563		8,00	7,767		76,00							
31	Dry rosé wine	2013-11	138,00	129,00	6,977		12,00	9,302		86,00							
32	Red Porto	2013-10	64,00	58,00	10,345		6,00	10,345		12,00							
33	Red wine	2014-02	74,00	76,00	-2,632		9,00	11,842		90,00							
34	Rosé Port	2014-02	115,00	102,00	12,745		9,00	8,824		12,00							
35	White wine	2014-03	131,00	118,00	11,017		11,00	9,322		87,00							
36	Sweet wine	2014-03	138,00	131,00	5,344		10,00	7,634		61,00							
37	White Port	2013-03	51,00	52,00	-1,923		8,00	15,385		11,00							
38	Aromatized wine	2014-05	109,00	92,00	18,478		8,00	8,696		56,00							
39	Red Port	2014-05	45,00	45,00	0,000		5,00	11,111		12,00							
40	White Wine	2014-06	109,00	93,00	17,204		9,00	9,677		69,00							
41	Red wine	2014-09	61,00	58,00	5,172		17,00	29,310		61,00							
42	Red Port	2014-10	64	52	23,077		6,00	11,538		10,00							
43	White wine	2015-01	83	73	13,699		7,00	9,589		65,00							
44	Red Port	2015-01	38	26	46,154		8,00	30,769		10,00							

45	Sparkling wine	2015-02	112	95	17,895		9,00	9,474		61,00							
46	Rosé Port	2015-02	29	43	-32,558		19,00	44,186		12,00							
47	White Port	2015-03	58	57	1,754		6,00	10,526		10,00							
48	Red Port	2015-10	38	34	11,765		8,00	23,529		7,00							
49	Red wine	2016-04	70	75	-6,667		10,00	13,333		64,00							
50	White wine	2017-01	106	88	20,455		6,00	6,818		70,00							

Tabela 49. Resultados do estudo da exatidão na determinação de cloretos

N	Produto	Data	L_v	A_v	$bias_{relative}$	$RMS_{bias_{relative}}$	S	$S_{R_{relative}}$	$\bar{S}_{R_{relative}}$	P	\bar{P}	$u(C_{Ref})_{relative}$	$u(bias)_{relative}$	$u(Rw_{relative,c})$	$u_{relative}$	k	$U_{relative}$
1	Sparkling wine	2012-01	22,00	18,00	22,222	23.050	2,00	11,111	22.708	10,00	14.500	7.472	24.231	0.852	24.246	2	48.492
2	White wine	2012-01	16,00	13,00	23,077		1,00	7,692		14,00							
3	Red wine	2012-02	26,00	25,00	4,000		2,00	8,000		15,00							
4	Naturally sweet wine	2012-02	32,00	30,00	6,667		4,00	13,333		14,00							
5	White wine	2012-03	13,00	10,00	30,000		3,00	30,000		17,00							
6	Fortified wine	2012-03	35,00	34,00	2,941		5,00	14,706		16,00							
7	Aromatized wine	2012-05	28,00	29,00	-3,448		4,00	13,793		16,00							
8	White wine	2012-10	39,00	40,00	-2,500		4,00	10,000		17,00							
9	Sparkling wine	2012-11	28,00	28,00	0,000		6,00	21,429		16,00							
10	Dry rosé wine	2012-11	18,00	18,00	0,000		2,00	11,111		15,00							
11	Red wine	2012-12	18,00	17,00	5,882		4,00	23,529		14,00							
12	Naturally sweet wine	2013-01	24,00	24,00	0,000		5,00	20,833		14,00							
13	White wine	2013-01	14,00	14,00	0,000		3,00	21,429		15,00							
14	Sparkling wine	2013-02	42,00	32,00	31,250		7,00	21,875		17,00							

15	Red wine	2013-02	37,00	35,00	5,714		6,00	17,143		17,00							
16	Aromatized wine	2013-05	24,00	24,00	0,000		3,00	12,500		14,00							
17	Sparkling wine	2013-05	20,00	18,00	11,111		3,00	16,667		14,00							
18	White wine	2013-06	12,00	13,00	-7,692		5,00	38,462		14,00							
19	White wine	2013-10	11,00	17,00	-35,294		11,00	64,706		11,00							
20	Dry rosé wine	2013-11	20,00	20,00	0,000		2,00	10,000		12,00							
21	Sparkling wine	2014-05	18,00	27,00	-33,333		7,00	25,926		13,00							
22	White Wine	2014-06	5,00	8,00	-37,500		2,00	25,000		14,00							
23	White wine	2014-10	4,00	10,00	-60,000		4,00	40,000		15,00							
24	Semi-sparkling wine	2014-11	5,00	9,00	-44,444		3,00	33,333		12,00							
25	Sparkling wine	2015-02	13,00	13,00	0,000		4,00	30,769		17,00							
26	Red wine	2015-04	31,00	29,00	6,897		6,00	20,690		19,00							
27	White wine	2015-10	16,00	17,00	-5,882		5,00	29,412		19,00							
28	White wine	2015-10	15,00	17,00	-11,765		5,00	29,412		19,00							
29	Sparkling wine	2016-02	13,00	21,00	-38,095		6,00	28,571		7,00							

30	Sparkling wine	2016-02	13,00	21,00	-38,095		6,00	28,571		7,00							
31	Aromatized wine	2017-05	24,00	30,00	-20,000		7,00	23,333		15,00							
32	Aromatized wine	2017-05	21,00	30,00	-30,000		7,00	23,333		15,00							